

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

Doktorská disertační práce

**Syntéza lidských  $\omega$ -O-acylceramidů a hodnocení  
jejich vlivu na bariérové vlastnosti kožních lipidových  
membrán**

**Mgr. Lukáš Opálka**

**2016**

# Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením doc. PharmDr. Kateřiny Vávrové Ph.D.). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Lukáš Opálka

V Hradci Králové dne 28. července 2016

## Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za odborné vedení, rady a neocenitelnou pomoc během celého studia.

Poděkování patří také členům Skin Barrier Research Group (zejména prof. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc.; Mgr. Petře Pullmannové, Ph.D.; Mgr. Barboře Školové, Ph.D.; Mgr. Monice Kopečné; Mgr. Andreji Kováčikovi a Mgr. Michaele Sochorové) a kolegům z Katedry anorganické a organické chemie (hlavně PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc.) za pomoc a podporu při výzkumu a při vzniku této práce.

Děkuji za pomoc také spolupracovníkům z VŠCHT v Praze (RNDr. Jaroslav Maixner, CSc.); z Freie Universität Berlin, Německo (skupina Dr. Sarah Hedtrich); z University of California, San Francisco, USA (Dr. Yoshikazu Uchida); z Hoshi University, Tokyo, Japonsko (Dr. Yasuko Obata); z German Cancer Research Center, Heidelberg, Německo (Dr. Roger Sandhoff a jeho skupina); z Université de Toulouse, Francie (Dr. Nathalie Jonca a její skupina) a z Univerzity Pardubice (skupina prof. Ing. Michala Holčapka Ph.D.)

Za finanční podporu děkuji zejména Univerzitě Karlově (GAUK č. 88615, GAUK č. 1868214 a SVV 260 291) a Grantové agentuře ČR (GAČR 16-25687J, 13-23891S a 207/11/0365).

Rád bych také poděkoval rodině a přátelům za podporu.

# 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  $\omega$ -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  $\omega$ -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 složitějšího 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 poškození 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  $\alpha$ -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.

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic chemistry

Candidate: Mgr. Lukáš Opálka

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

Title of doctoral thesis: Synthesis of human  $\omega$ -O-acylceramides and evaluation of their effects on barrier properties of skin lipid membranes

The main objective of this work was to synthesize and study human acylceramides (acylCer, ceramides of the EO type) with the focus on the relationships between the acylCer concentration, structure of their polar head, their ability to form lamellar phases and permeability of model lipid membranes. Another objective was to synthesize ceramide-1-phosphates for the study of their signaling role in skin barrier and an analogue of ganglioside GM1 with shorter acyl chain as a standard for analysis of these lipids.

Ceramides (Cer) belong to the family of sphingolipids. They are the central molecules in sphingolipid metabolism, they participate on cell regulatory processes and the formation of human skin lipid barrier. The main skin barrier is situated in the *stratum corneum* (SC), which is the uppermost layer of skin. The purpose of SC is to maintain homeostasis of the inner environment and to prevent the penetration of exogenous substances, allergens and bacteria to the organism.

AcylCer are composed of sphingoid base, which is acylated by ultra-long ( $\geq 30C$ ) acid, esterified by linoleic acid at its  $\omega$ -hydroxyl group. AcylCer are the longest Cer occurring in the skin and they are essential for the proper function of the skin. Their complete deficit is lethal due to immense water loss through the skin. Healthy skin barrier contains approximately 9% of acylCer (of all Cer). Disturbances in the acylCer levels (mostly decreased levels) were found in several severe skin diseases, such as atopic dermatitis, psoriasis of lamellar ichthyosis.

Due to commercial unavailability of acylCer, we needed to develop and optimize their complete synthesis. The starting compound for this synthesis was 16-bromohexadecanoic acid. This acid served as a precursor for the preparation both the phosphonium salt and aldehyde, two reactants for Wittig reaction, which was a key step in this synthesis that

enabled the preparation of the ultra-long chain. Resulting 32C unsaturated acid was converted to succinimidyl ester, which increased its solubility and simultaneously served as a protecting group during its acylation with linoleic acid. Linoleic acid was attached to the ultra-long hydroxyl acid using Yamaguchi esterification reaction. In the last step, succinimidyl ester of the acid reacted with sphingoid base resulting in the desired acylCer. 12-step synthesis with overall 11% yield (in tens of milligrams), and 7% (in gram amounts) was developed.

Next, Cer-1-phosphates and modified gangliosides were synthesized. Cer-1-phosphates were synthesized using interphase phosphorylation with  $P(OCH_3)_3$ , followed by the hydrolysis of methyl groups to obtain two Cer-1-phosphates based on sphingosine and dihydrosphingosine in the overall yields 34% and 45%. These compounds will be used for the study of their role in cell signalization during the formation of skin barrier and their behavior in lipid membranes. Ganglioside GM1 with shorter acyl chain was prepared as a standard for ganglioside quantification. Natural ganglioside GM1 was used as a starting compound. It was enzymatically deacylated and then acylated again with an acid with shorter chain to obtain the product in 40% overall yield.

The prepared acylCer were used for the preparation of model lipid membranes mimicking the skin lipid barrier. Two series of the membranes were prepared – a simple and complex model. The simple model was composed of one acylCer (Cer EOS)/one Cer (Cer NS)/lignoceric acid/cholesterol with addition of cholesteryl sulfate. Using X-ray powder diffraction we studied the concentration of Cer EOS necessary for the formation of the long periodicity phase (essential for the proper barrier function of the skin). It was found, that this phase appears at 10% concentration of Cer EOS and coexists with the short periodicity phase. At 30% Cer EOS, the short periodicity phase disappeared. Though in permeability experiments, this model showed to be too simple and the addition of acylCer to the membrane led to increase in the permeability to model compounds.

To obtain results relevant to *in vivo* findings, the simple model was substituted by more complex model that contained different acylCer (or their mixture), mixture of Cer, mixture of fatty acids, cholesterol and an addition of cholesteryl sulfate. Experiments with complex model were focused on the comparison of different structures of acylCer polar head. The permeability of all membranes of the complex model containing acylCer was decreased compared to control (without acylCer), which correlates much better with the experiments using human skin. However, X-ray powder diffraction measurements showed that only the most complex membrane with the mixture of acylCer forms the long periodicity phase. These results for the first time describe the relationships between the acylCer structure and



their behavior in lipid membranes. In the future, this model will be used in preparation of the models of lipid barrier in skin diseases and to study compounds with potential ability to regenerate impaired skin barrier.

The prepared acylCer were also used as standards for the quantification of acylCer in biological material. Using HPTLC, we were able to prove that the prepared acylCer occur in skin. We also improved their quantitative analysis and found that identical standards are necessary for their proper quantification. Using incorrect standards may lead to errors reaching up to hundreds percent. AcylCer were also used for quantification of lipids in reconstructed skin with filaggrin knockdown as a model of atopic dermatitis. It was found that peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  agonists improve skin homeostasis, increase skin barrier function and normalize the composition of free fatty acids.

To conclude, an efficient, scalable and reliable synthesis of human ultra-long Cer was developed. The synthesized acylCer were used for the preparation of model lipid membranes simulating healthy or impaired skin, which opens new possibilities of *in vitro* evaluation of potential drugs for the treatment of severe skin diseases, such as atopic dermatitis or psoriasis. These acylCer were also used to improve quantitative analysis of lipids in skin samples.

# Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	7
Obsah.....	10
1. Úvod.....	13
2. Cíl práce .....	15
3. Teoretická část.....	16
3.1. Kůže.....	16
3.1.1. Epidermis.....	16
3.2. Stratum corneum (SC) .....	17
3.2.1. Volné mastné kyseliny, cholesterol a jeho deriváty.....	18
3.2.2. Ceramidy (Cer).....	18
3.2.2.1. Typy ceramidů.....	18
3.2.2.2. Biosyntéza ceramidů.....	20
3.2.3. Acylceramidy (acylCer) .....	23
3.2.3.1. Biosyntéza acylCer .....	23
3.2.4. Metabolické přeměny ceramidů a dalších sfingolipidů .....	25
3.2.4.1. Ceramid-1-fosfáty (Cer-1-P).....	27
3.2.4.2. Gangliosidy.....	27
3.2.5. Organizace lipidů ve SC .....	27
3.2.5.1. Lamelární uspořádání .....	27
3.2.5.2. Laterální uspořádání .....	28
3.2.5.3. Vznik kožní bariéry .....	29
3.3. Kožní onemocnění se sníženou hladinou acylCer.....	30
3.3.1. Atopická dermatitida (AD).....	30
3.3.2. Psoriáza .....	31

3.3.3.	Lamelární ichtyóza (LI) .....	31
4.	Výsledky .....	32
4.1.	Syntéza lidských acylCer s ultra-dlouhým řetězcem .....	32
4.2.	Potvrzení struktury polární hlavy acylCer s použitím 2D NMR analýzy .....	37
4.2.1.	Cer EOS .....	38
4.2.2.	Cer EOP .....	40
4.2.3.	Cer EOdS .....	42
4.2.4.	Cer EOH .....	44
4.3.	Syntéza Cer-1-P .....	46
4.4.	Syntéza modifikovaného gangliosidu GM1 .....	46
4.5.	$\omega$ -O-acylCer v kožních lipidových membránách: vliv koncentrace, sfingoidní báze a složitosti modelu na mikrostrukturu a permeabilitu .....	48
4.6.	LPP se začíná objevovat při 10 % Cer EOS v jednoduchém modelu .....	49
4.7.	Cer EOS neočekávaně zvyšuje permeabilitu jednoduchého modelu .....	51
4.8.	Komplexní model lépe napodobuje vliv acylCer na permeabilitu .....	53
4.9.	Pouze Cer EO-mix, nikoliv jednotlivé acylCer tvoří LPP v komplexním modelu ..	54
4.10.	Laterální uspořádání lipidů .....	55
5.	Diskuse .....	57
5.1.	Syntéza lidských acylCer s ultra-dlouhým řetězcem .....	57
5.2.	Syntéza Cer-1-P .....	58
5.3.	Syntéza modifikovaného gangliosidu GM1 .....	58
5.4.	$\omega$ -O-acylceramidy v kožních lipidových membránách: vlivy koncentrace, sfingoidní báze a složitosti modelu na mikrostrukturu a permeabilitu .....	59
5.4.1.	Membrány jednoduchého modelu velmi dobře reprodukuje mikrostrukturu lipidů SC, ale nikoliv však jejich permeabilitu .....	59
5.4.2.	Permeabilita komplexních lipidových membrán: nejlepší bariérové funkce dosáhly Cer EOP a EOdS .....	62
5.4.3.	Pouze směs tří acylCer tvoří LPP v membránách komplexního modelu .....	64
5.5.	HPTLC analýza ultra-dlouhých ceramidů v kůži .....	65

5.6.	Stimulace PPAR $\alpha$ receptorů normalizuje složení kožních lipidů a zlepšuje kožní bariéru normální a filaggrin deficitní rekonstruované kůže .....	67
6.	Závěr .....	72
7.	Experimentální část .....	74
7.1.	Chemikálie .....	74
7.2.	Potvrzení struktury a čistoty připravených látek.....	74
7.3.	Syntéza ultra-dlouhých ceramidů.....	75
7.4.	Syntéza ceramid-1-fosfátů a modifikovaného gangliosidu .....	87
7.5.	Příprava modelových membrán SC .....	92
7.6.	Prášková rentgenová difrakce (XRPD) .....	92
7.7.	Permeabilitní experimenty .....	93
7.8.	Ztráta vody přes membrány .....	93
7.9.	Elektrická impedance.....	94
7.10.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	94
7.11.	Vyhodnocení dat.....	94
8.	Seznam zkratk .....	96
9.	Seznam použité literatury.....	98
10.	Seznam publikovaných prací .....	112
10.1.1.	Publikace jako první autor .....	112
10.1.2.	Publikace jako spoluautor .....	112
11.	Přílohy .....	113

# 1. Úvod

Ceramidy (Cer) jsou centrální molekuly ve sfingolipidovém metabolismu. U savců, Cer zastávají důležitou regulační úlohu v buňkách (např. ovlivnění buněčného růstu, metabolismu, diferenciací a buněčné smrti),<sup>1-2</sup> ale také jsou nezbytnou součástí extracelulárního prostoru (např. kožní bariéra).<sup>3</sup> Kožní bariéra se nachází v nejsvrchnější vrstvě epidermis, ve *stratum corneum* (SC), které se skládá z korneocytů, obklopených lamelární lipidovou matrix (složenou z přibližně ekvimolární směsi Cer, mastných kyselin a cholesterolu s malým množstvím cholesteryl-sulfátu).<sup>4</sup> Cer se skládají ze sfingoidní báze (sfingosinu, fytosfingosinu, dihydrosfingosinu, 6-hydroxysfingosinu a dosud strukturně přesně neobjasněné sfingoidní báze se čtyřmi hydroxylovými skupinami), jejíž aminoskupina je acylována nesubstituovanou,  $\alpha$ -hydroxylovanou nebo  $\omega$ -hydroxylovanou (s volnou OH skupinou nebo esterifikovanou kyselinou linolovou) kyselinou. Kombinací těchto možností získáme různé podtřídy Cer. Do této chvíle bylo v lidské kůži identifikováno 15 podtříd Cer,<sup>5</sup> což při započtení rozdílných délek lipofilních řetězců dává vzniknout více než 400 různým molekulám Cer. Organizace lipidů SC je vysoce specializovaná, aby umožnila zabránit příliš velkým ztrátám vody z organismu, případně zabránit průniku nežádoucích látek z prostředí do organismu. Na rozdíl od ostatních biologických membrán obsahuje lipidová matrix SC dvě opakující se lamelární fáze: krátkou periodickou fází (SPP) s mezivinnou vzdáleností 5,3 – 6,4 nm<sup>6-10</sup> a dlouhou periodickou fází (LPP) s mezivinnou vzdáleností 11,9 – 13,1 nm.<sup>7, 9, 11-14</sup>

Nejdelší Cer nalezené v lidské kůži jsou Cer vzniklé kombinací sfingoidní báze a ultra-dlouhého (C28-34),  $\omega$ -hydroxylovaného řetězce s esterově vázanou kyselinou linolovou (kyselina linolová je u člověka dominantní<sup>15</sup>). Tyto Cer se také nazývají acylceramidy (acylCer) nebo Cer třídy EO. AcylCer jsou sice minoritní složkou SC, na druhou stranu jsou ale naprosto nezbytné pro přežití savců na souši.<sup>4</sup> Výrazné defekty v biosyntéze acylCer, případně v jejich transportu vedou k novorozenecké smrti díky obrovským ztrátám vody přes kůži.<sup>16-17</sup> Menší odchylky v jejich množství byly popsány u některých závažných kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida,<sup>18</sup> psoriáza<sup>19</sup> nebo lamelární ichthyóza.<sup>20</sup> Biosyntéza acylCer se odlišuje od ostatních Cer. Syntéza jejich ultra-dlouhých řetězců vyžaduje speciální enzymový komplex ze skupiny elongáz, elongázu ELOVL4, která po dvouuhlíkatých jednotkách prodlužuje řetězec až na potřebnou délku,<sup>21</sup> dále vyžadují enzym pro  $\omega$ -hydroxylaci, cytochrom P450 CYP4F22 hydroxylázu;<sup>22</sup>  $\omega$ -acyl transferázu zodpovědnou za  $\omega$ -esterifikaci<sup>23</sup> a na konec speciální Cer syntázu CERS3,<sup>16</sup> zodpovědnou za navázání acylu ke sfingoidní bázi.

Hlubšímu porozumění roli těchto neobvykle dlouhých Cer v lidské (pato)fyziologii brání jejich velmi omezená dostupnost. Tyto látky nejsou komerčně dostupné a jejich izolace z kůže je obtížná. Přestože jejich syntéza již byla publikována,<sup>24-26</sup> totální syntéza těchto látek stále zůstává velkou výzvou, díky jejich velmi omezené rozpustnosti a nízké reaktivitě. Přestože role acylCer v kožní bariéře byla již v minulosti zkoumána,<sup>7, 9, 11-12, 18-20, 27-29</sup> příspěvek jednotlivých podtříd acylCer na tvorbě LPP a přímá spojitost mezi LPP a kožní permeabilitou (permeabilitou membrán) stále nebyly zcela pochopeny.

Cer se společně se svými deriváty (sfingosin-1-fosfát, ceramid-1-fosfáty, gangliosidy) podílejí v buňkách na buněčné signalizaci a modulaci buněčných funkcí.<sup>2, 30</sup> Zároveň Cer a jejich deriváty mohou být využity i terapeuticky. Modulací jejich hladin v organismu lze dosáhnout pozitivních výsledků v léčbě nebo prevenci rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, imunitních poruch nebo ekzému.<sup>30-32</sup> Studium těchto derivátů je omezeno jejich komerční nedostupností, případně omezenou dostupností.

V současné době nejsou k dispozici všechny standardy Cer podtříd pro kvantitativní stanovení Cer v lidské kůži (včetně acylCer), proto se často pro kvantifikaci určitého Cer využívá jiná podtřída Cer. Tato substituce však může vést ke vzniku chyby v kvantifikaci. Proto je nezbytné připravit všechny podtřídy Cer pro účely zpřesnění analýzy lipidů lidské kůže.

Analýza kožních lipidů umožňuje studovat vztahy mezi dalšími složkami kožní bariéry a lipidy, či sledovat vliv potenciálních léčiv na lipidovou kožní bariéru. V dnešní době jsou terapeutické možnosti pro léčbu kožních onemocnění spojených s filaggrinem omezené a převážně zaměřené na léčbu symptomů, například protizánětlivými nebo imunosupresivními léky. Agonisté receptoru aktivovaného peroxizomovými proliferátory (PPAR) zvyšují expresi filaggrinu (ukazatel pozdní diferenciaci lidské kůže, hrající klíčovou roli ve funkci kožní bariéry) a dalších strukturních proteinů v kůži.<sup>33-34</sup> Navíc PPAR agonisté mají protizánětlivé a prospěšné působení na kožní homeostázu a integritu SC,<sup>34-38</sup> což z nich dělá potenciální kandidáty pro léčbu mimo jiné kožních onemocnění, spojených s nedostatkem filaggrinu. Specifické efekty PPAR agonistů na kožní bariéru jsou stále nedostatečně prozkoumány.

## 2. Cíl práce

Hlavním cílem této práce byla syntéza a studium Cer se zaměřením na Cer s ultra-dlouhým řetězcem (acylCer) a popis jejich chování v modelových lipidových membránách pomocí permeabilitních studií a biofyzikálních metod. Připravené Cer byly dále využity pro zlepšení kvalitativní i kvantitativní analýzy lipidů v biologickém materiálu. Získané znalosti mohou podhalit roli těchto Cer ve zdravé a nemocné kůži a mohou pomoci lépe navrhnout terapii některých kožních onemocnění, například atopické dermatitidy, psoriázy či lamelární ichtyózy. Cílem této práce byla i příprava některých derivátů Cer (Cer-1-fosfátů a gangliosidů) pro další studium role těchto sfingolipidů v lidském organismu.

Vlastní práce je rozdělena do několika oddílů s dílčími cíli práce. Prvním cílem této práce byla *de novo* syntéza všech čtyř lidských acylCer (jmenovitě Cer EOS, EOP, EOdS a EOH) a přesné určení jejich struktury pomocí pokročilých NMR experimentů. Připravené acylCer byly dále využity pro potvrzení jejich přítomnosti v kožní bariéře pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie a pro porovnání této metody s výsledky v literatuře. Dalším cílem práce bylo použít připravené acylCer pro přípravu modelových lipidových membrán s cílem studovat vztahy mezi koncentrací acylCer, strukturou jejich polární hlavy, tvorbou lamelárních fází a permeabilitou modelových lipidových membrán na dvou úrovních složitosti. Tyto acylCer byly rovněž využity při kvantifikaci lipidů v modelech normální a filaggrin deficitní kůže, kde byl zkoumán vliv PPAR agonistů (WY14643, ciglitazonu a dokosahexaenové kyseliny) na homeostázu a bariérovou funkci těchto modelů. Posledním cílem této práce byla syntéza dvou Cer-1-fosfátů s cílem prozkoumat jejich úlohu v buněčné signalizaci při tvorbě kožní bariéry a jejich chování v lipidových membránách a syntéza modifikovaného gangliosidu pro kvantitativní stanovení gangliosidů v biologických vzorcích.

Experimentální část a výsledky popisují jen ty pokusy, které jsem osobně prováděl, v diskusi jsou pak výsledky zasazeny do kontextu publikovaných prací.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Kůže

Kůže je plošný orgán, který tvoří zevní povrch organismu. Mezi nejdůležitější funkce kůže patří bariérová funkce; kůže chrání organismus před průnikem toxických látek alergenů nebo bakterií do těla a zároveň chrání před nadměrnými ztrátami vody z těla, což savcům umožňuje přežít na suché zemi. Mezi další funkce kůže patří termoregulace, látková výměna, imunitní odpověď nebo tvorba vitamínu D.<sup>3-5, 39-41</sup>

Plocha kůže dospělého člověka se blíží 2 m<sup>2</sup> a její tloušťka se pohybuje v rozmezí 0,5 až 4 mm. Nejtenčí je kůže na očních víčkách a na penisu, naopak nejtlustší je na zádech, kde tloušťka dosahuje až 4 mm. Hmotnost samotné kůže dosahuje 3 kg, pokud ale započítáme i podkožní tukovou tkáň, hmotnost může narůst až na 20 kg.<sup>41</sup>

Kůže se rozděluje na 2 základní části: epidermis a dermis; a pomocí podkožního vaziva je vázána na kosterní nebo svalovou tkáň. Struktura kůže a epidermis je znázorněna na Obrázku 1.

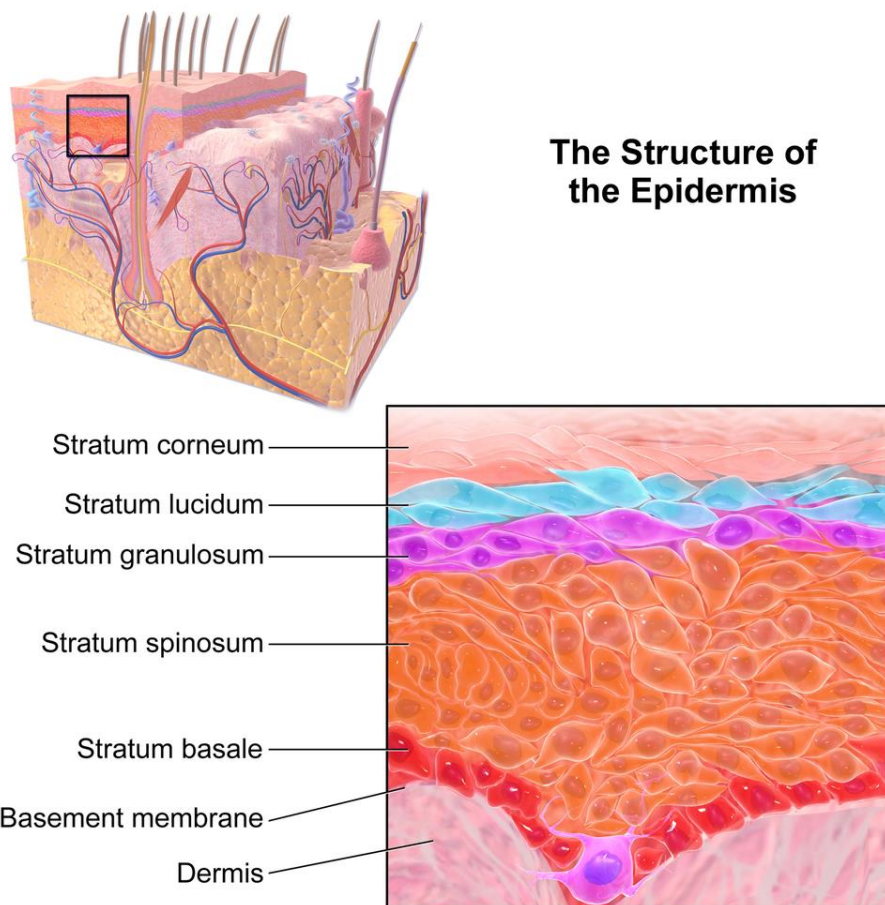
#### 3.1.1. Epidermis

Epidermis je vnější vrstva kůže, která je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Tvoří ji převážně keratinocyty v různém stádiu vývoje, ale můžeme zde nalézt i jiné buňky, například Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky nebo melanocyty. V epidermis můžeme rozlišit několik vrstev:

1. *Stratum basale* – je jediná vrstva buněk při bazální membráně, kde dochází k buněčnému dělení a tvorbě nových buněk.
2. *Stratum spinosum* – tvoří ho 2 – 5 vrstev buněk, které se postupně oplošťují do tvaru, který je pozorovatelný ve vyšších vrstvách kůže. Zde už neprobíhá mitóza.
3. *Stratum granulosum* – je vrstva 1 – 3 řad buněk, kde se začíná vytvářet keratohyalin (prekurzor keratinu). Buňky z této vrstvy postupují k povrchu a postupně se diferencují a odumírají.
4. *Stratum lucidum* – následuje za *stratum corneum* a je to tenká vrstva, pozorovatelná převážně v tlustší epidermis. Obsahuje navíc eleidin, což je další z prekurzorů keratinu.



5. *Stratum corneum* – nejsvrchnější vrstva epidermis, ve které jsou keratinocyty odumřelé a plně zrohovatělé (nazývají se také korneocyty) a postupně se z povrchu odlupují (*stratum disjunctum*)



Obrázek 1. Schéma lidské kůže, ve výřezu jsou jednotlivé vrstvy epidermis (Blausen.com staff. "Blausen gallery 2014". *Wikiversity Journal of Medicine* 1 (2). doi: 10.15347/wjm/2014.010, ISSN 20018762)

### 3.2. *Stratum corneum* (SC)

SC je zodpovědné za bariérovou funkci kůže. Skládá se ze zploštělých korneocytů (v 15 – 25 řadách), které jsou obklopeny lipidovou matrix, což je část, která je vlastním nositelem bariérové funkce.<sup>4</sup> Lipidová matrix se skládá z přibližně ekvimolární směsi Cer, volných mastných kyselin a cholesterolu s minoritním přídavkem dalších látek (například cholesteryl-sulfát). Při přepočtení na hmotnost tvoří Cer asi 50 % hmotnosti lipidové matrix.

### 3.2.1. Volné mastné kyseliny, cholesterol a jeho deriváty

Volné mastné kyseliny jsou ve SC téměř výhradně nasycené. Délka řetězců nasycených mastných kyselin se pohybuje v rozmezí 14 – 34C a řetězce mohou mít jak sudý, tak i lichý počet atomů. Nenasycené kyseliny mají pouze sudý počet atomů uhlíku, většinou jednu nebo dvě dvojná vazby a délku řetězců mezi 16 – 18C a 30 – 36C. Nejčastěji se vyskytuje kyselina lignocerová (24C) a kyselina cerotová (26C), které dohromady tvoří více než 50 % hmotnosti mastných kyselin. Ve SC jsou preferovány kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku, které představují více než 80 % hmotnosti mastných kyselin. Byly zde nalezeny i hydroxylované mastné kyseliny, avšak pouze v minoritním množství.<sup>42-43</sup>

Cholesterol je hlavním zástupcem sterolů ve SC. Pro správné fungování kožní bariéry je zcela nezbytný, podílí se na zachování správné struktury, fluidity, orientace lipidů a udržuje správnou lamelární a laterální strukturu SC.<sup>40, 44</sup> Cholesteryl-sulfát je derivátem cholesterolu a ve SC se nachází v přibližně 5 % množství. Předpokládá se, že hraje roli při deskvamaci.<sup>45</sup>

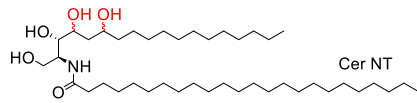
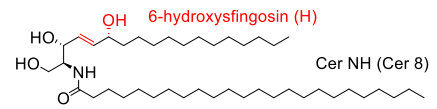
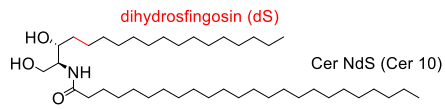
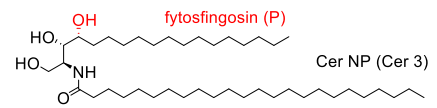
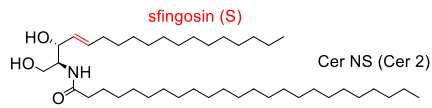
### 3.2.2. Ceramidy (Cer)

Cer patří do rodiny sfingolipidů. Podílejí se jak na buněčných procesech jako regulátory,<sup>2</sup> tak i na bariérové funkci kůže jako stavební kameny.<sup>46</sup>

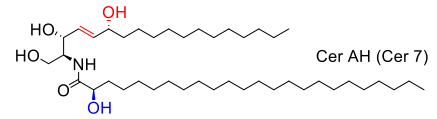
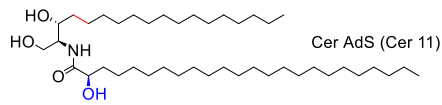
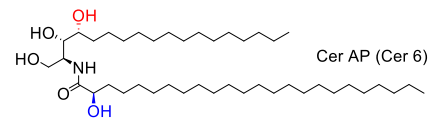
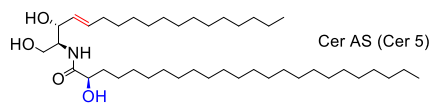
#### 3.2.2.1. Typy ceramidů

V současnosti je známo 15 podtříd Cer<sup>5</sup> a pokud do tohoto výčtu zahrneme i délku řetězců, dostaneme se na přibližně 400 různých molekul, což z těchto látek dělá velmi rozmanitou skupinu lipidů. Cer se skládají ze sfingoidní báze (sfingosin (S), fytosfingosin (P), dihydrosfingosin (dS), 6-hydroxysfingosin (H) a v současnosti příliš neprozkoumaná sfingoidní báze se čtyřmi hydroxylovými skupinami (T)), což je aminoalkohol s dlouhým řetězcem (14 – 28C). Primární aminoskupina této sfingoidní báze je acylována nenasycenou (N),  $\alpha$ -hydroxylovanou (A) nebo  $\omega$ -hydroxylovanou kyselinou (O). Délka acylu se v lidském SC pohybuje od 16 do 36C. Cer navíc může být esterifikován v  $\omega$ -poloze kyselinou linolovou (EO), případně v poloze 1 nesubstituovanou kyselinou (1-O-acylCer).<sup>47</sup> Upřednostňovaná forma názvosloví kožních Cer byla navržena roku 1993<sup>19</sup> a byla ještě doplněna roku 1994<sup>48</sup> a roku 2014.<sup>5</sup> Využívá symbolů sfingoidních bází a acylů, jejichž kombinací vzniká název příslušné podtřídy Cer, například Cer AS je odvozen od sfingosinu, který je acylován  $\alpha$ -hydroxylovanou kyselinou a Cer EOH je odvozen od 6-hydroxysfingosinu, který je acylován

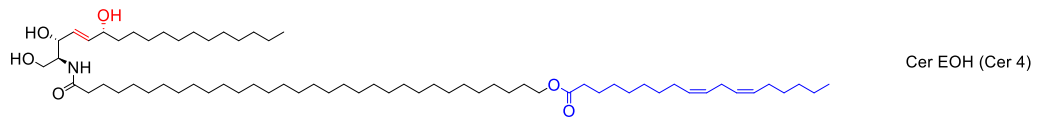
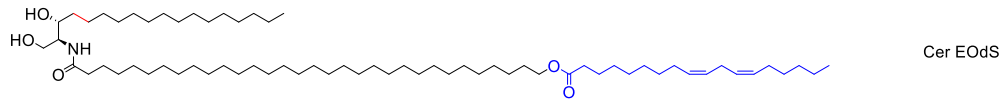
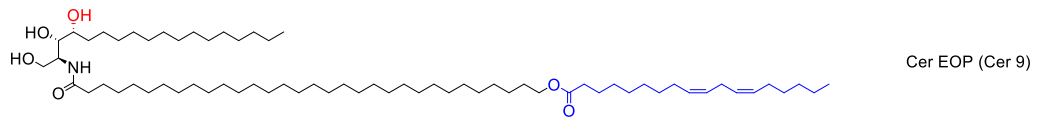
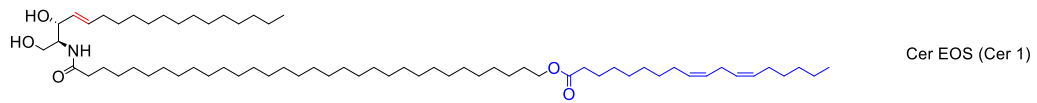
### Ceramidy s nesubstituovaným acylem (N)



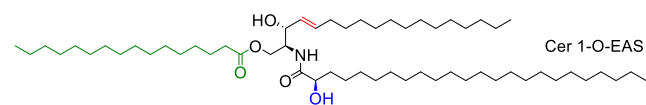
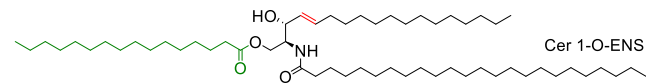
### Ceramidy s $\alpha$ -hydroxylovaným acylem (A)



### Ceramidy s $\omega$ -esterifikovaným acylem (EO)

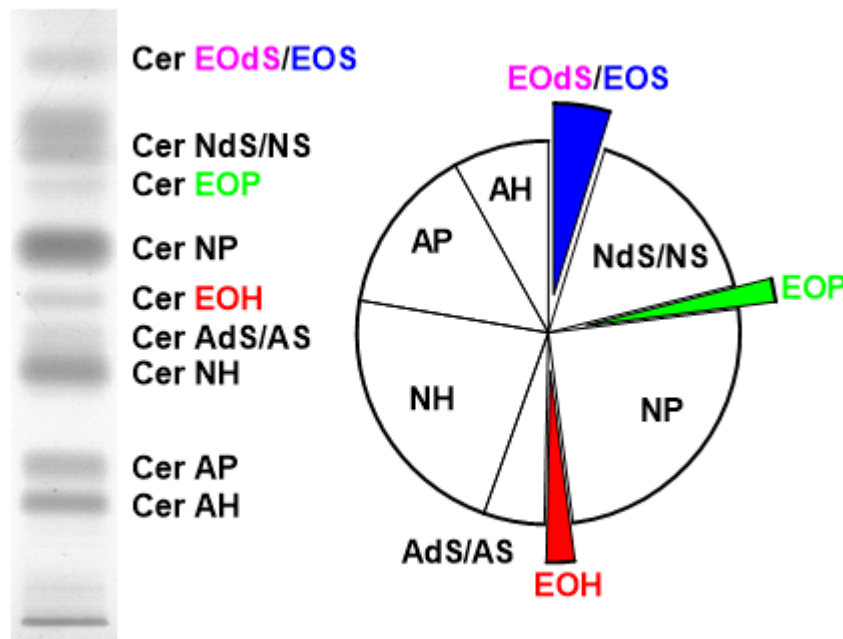


### 1-O-acyl ceramidy



Obrázek 2. Struktury Cer nalezonych v lidské kůži

$\omega$ -hydroxylovanou kyselinou s navázanou kyselinou linolovou na její  $\omega$ -hydroxylové skupině. Struktury lidských Cer nalezených v kůži jsou zobrazeny na Obrázku 2 a jejich kvantifikace na Obrázku 3.

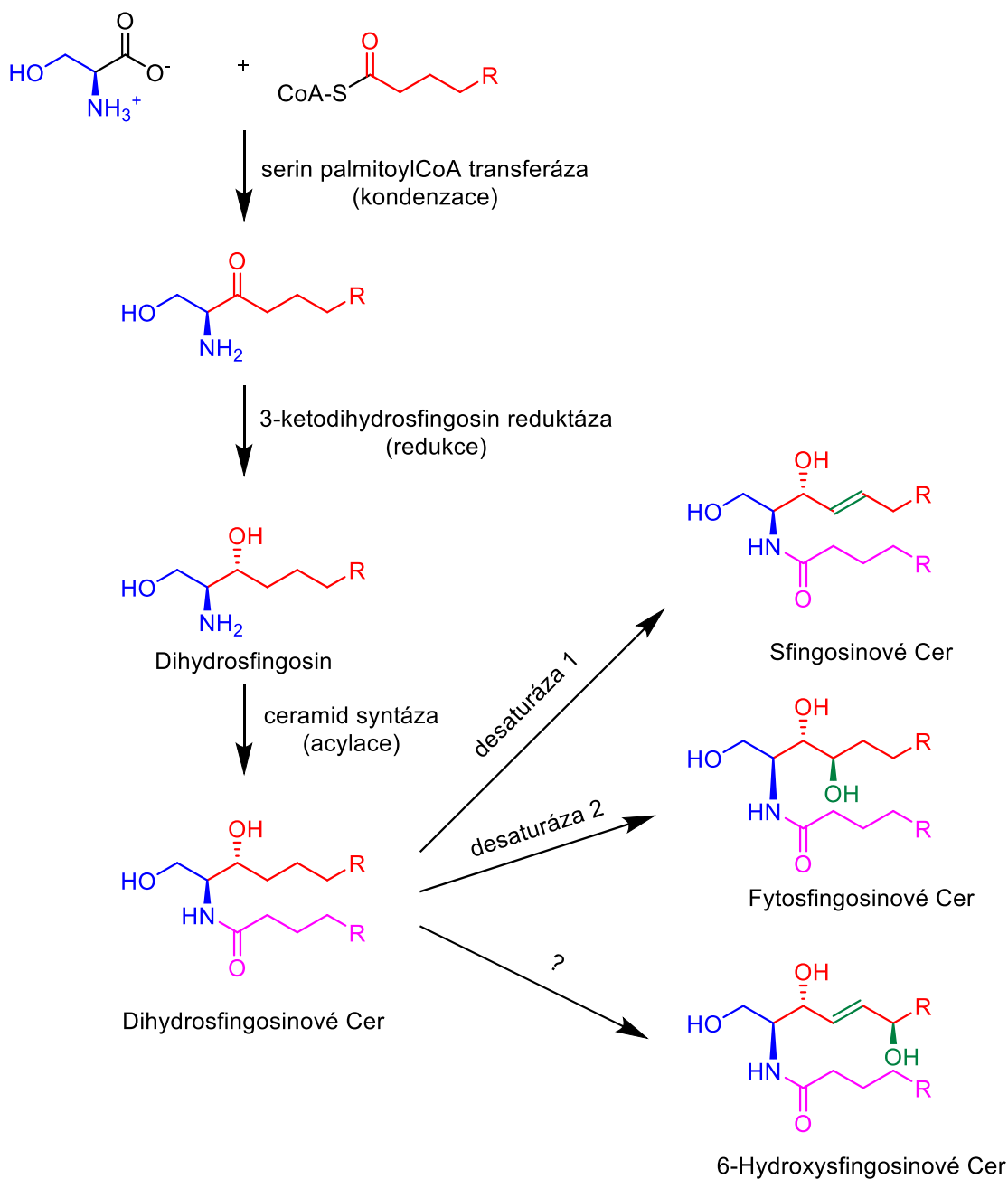


Obrázek 3. HPTLC lidských Cer (vlevo) a jejich kvantifikace pomocí HPTLC (vpravo)<sup>49</sup>

### 3.2.2.2. Biosyntéza ceramidů

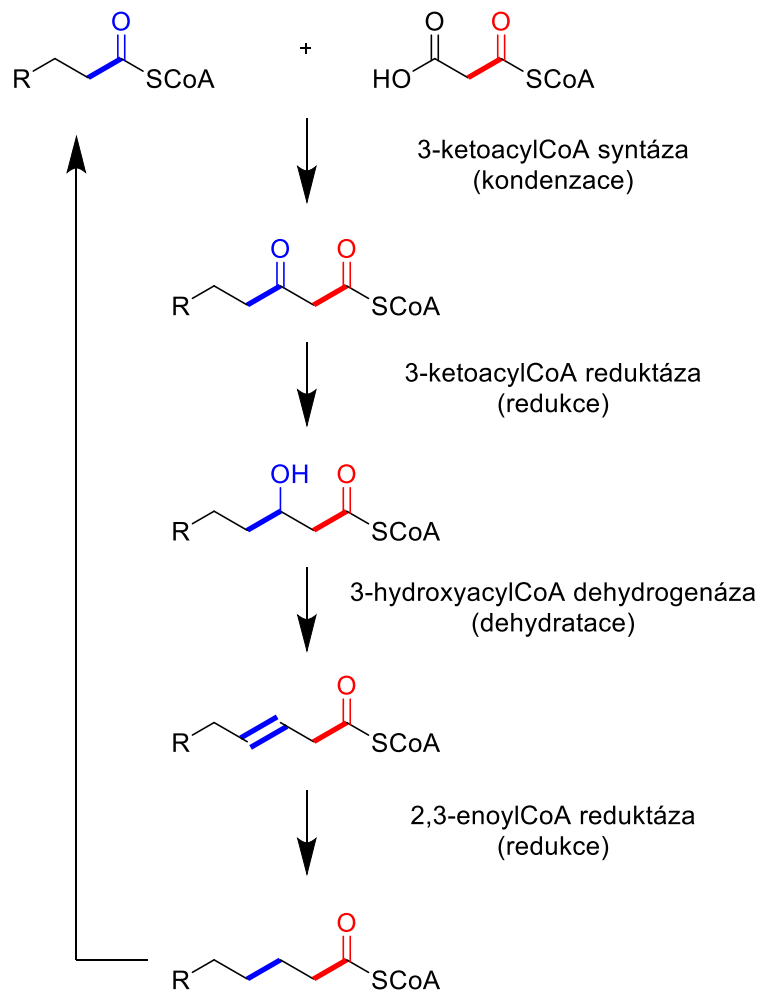
Biosyntéza Cer probíhá na membráně endoplazmatického retikula (Obrázek 4). První reakcí při biosyntéze Cer je kondenzace L-serinu s palmitoylkoenzymem A (palmitoylCoA) za vzniku 3-ketodihydrosfingosinu. Enzym, který tuto reakci umožňuje, se nazývá serin palmitoylCoA transferáza a jedná se o enzym ze skupiny  $\alpha$ -oxoamin syntáz.<sup>50</sup> 3-Ketodihydrosfingosin se v buňkách nalézá v malém množství, protože je ihned dále metabolizován. Následující reakcí je redukce ketoskupiny pomocí enzymu 3-ketodihydrosfingosin reduktázy za vzniku dihydrosfingosinu.<sup>51</sup> K převedení dihydrosfingosinu na ostatní sfingoidní báze nedochází okamžitě, dochází k němu až po acylaci primární aminoskupiny. Jeden z důvodů, proč ostatní sfingoidní báze nevznikají rovnou je ten, že sfingosin má proapoptotické a detergentní účinky.<sup>52</sup> Acyl kyseliny je připojen prostřednictvím skupiny enzymů, nazvané (dihydro)ceramid syntázy (CerS). Zatím bylo identifikováno šest podskupin CerS (CerS 1 – 6)<sup>53</sup> a bylo zjištěno, že ačkoliv se jejich substráty částečně překrývají, vykazuje každý enzym svou preferenci k určité délce acylu, případně stupni nenasycenosti. Například CerS 1 má preferenci ke stearylkoenzymu A jako

substrátu za vzniku C18 Cer.<sup>54</sup> Posledním krokem je úprava sfingoidní části. Cer založené na sfingosinu získají C4-C5 dvojnou vazbu působením desaturázy. Tento enzym nejprve využije molekulární kyslík a vnese do pozice C4 v molekule hydroxylovou skupinu, která je následně dehydratována za vzniku C4-C5 dvojně vazby.<sup>55-57</sup> Cer založené na fytosfingosinu jsou hydroxylovány v pozici C4 pomocí enzymu desaturázy 2. Enzym zodpovědný za konverzi dihydroCer na 6-hydroxyCer nebyl zatím nalezen.<sup>5, 58</sup>



Obrázek 4. Biosyntéza ceramidů

Mastné kyseliny do délky řetězce C16 jsou u savců syntetizovány pomocí multienzymového komplexu, zvaného syntáza mastných kyselin. Prodlužování řetězce nad tuto délku potřebuje speciální typ enzymu, zvaný elongáza (ELOVL), Obrázek 5. Elongázy vykazují jak tkáňovou specifitu (v kůži se vyskytují pouze čtyři poddruhy tohoto enzymu), tak i substrátovou specifitu. ELOVL1 preferuje jako substrát řetězce až do délky C24, ELOVL2 mezi C16-C20, ELOVL3 C22-C26, ELOVL4 C20 a C22, ELOVL5 C16-C20 a ELOVL6 C12, C16, C18. Zároveň bylo zjištěno, že ELOVL1, 3 a 6 preferují nasycené nebo mononenasycené kyseliny a ELOVL2, 4 a 5 preferují polynenasycené kyseliny. Avšak přesné substráty elongáz nebyly zatím přesně určeny. Prodlužování řetězce probíhá vždy o dva uhlíkové atomy a je to cyklicky se opakující děj, který zahrnuje kondenzaci acylCoA s malonylCoA (enzym 3-ketoacylCoA syntáza), redukci (enzym 3-ketoacylCoA reduktáza), dehydrataci (enzym 3-hydroxyacylCoA dehydrogenáza) a další redukci (enzym 2,3-enoylCoA reduktáza).



Obrázek 5. Elongace volných mastných kyselin

Enzym, zodpovědný za  $\alpha$ -hydroxylaci mastné kyseliny je 2-hydroxyláza<sup>59</sup> a  $\omega$ -hydroxylace mastné kyseliny bude probrána v následující kapitole.

### 3.2.3. Acylceramidy (acylCer)

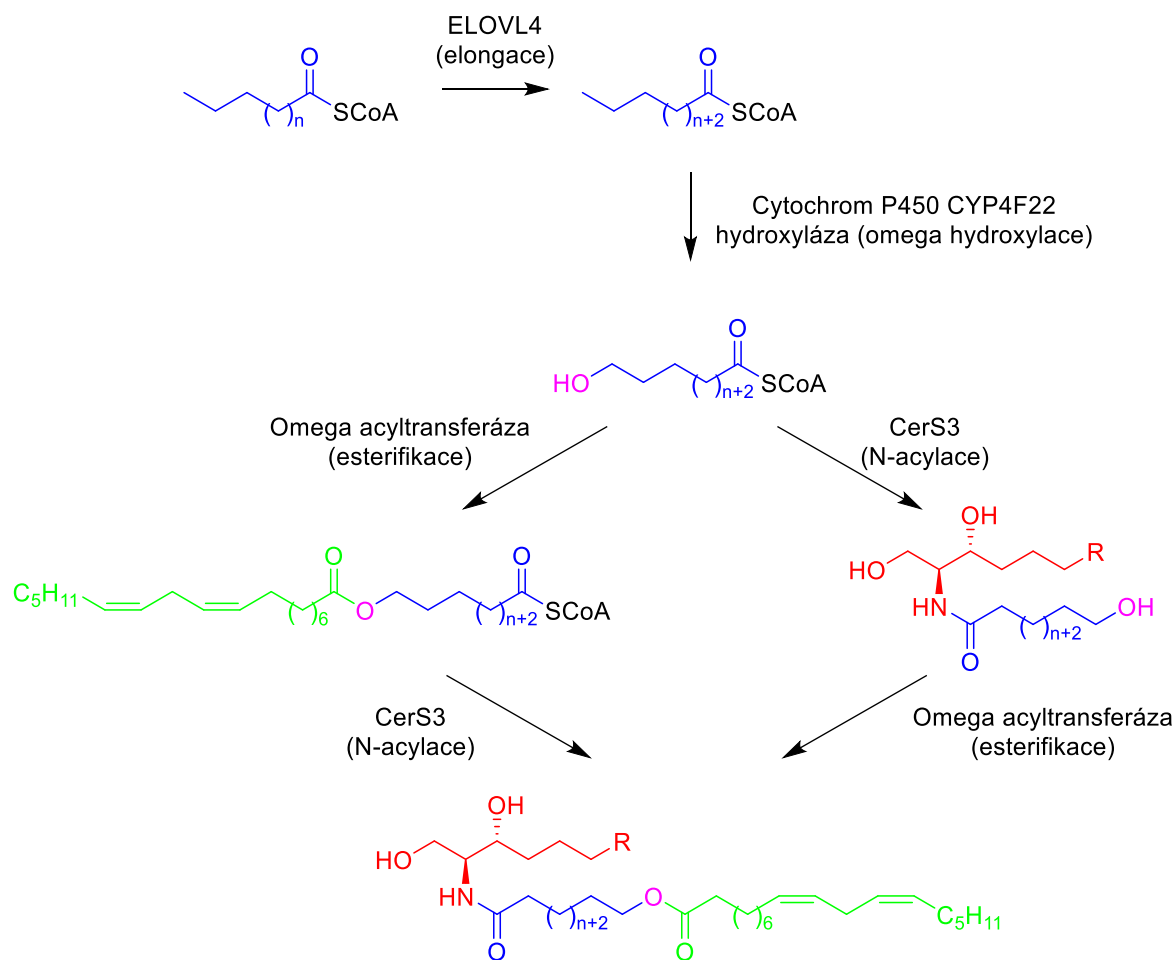
$\omega$ -O-acylceramidy (nazývány také Cer třídy EO) jsou nejdelší Cer, které se v lidském těle vyskytují. Stejně jako kratší Cer se skládají ze sfingoidní báze (sfingosinu, fyto sfingosinu, dihydrosfingosinu a 6-hydroxysfingosinu), na jejíž primární aminoskupinu je vázán acyl kyseliny. V případě acylCer má acyl nejčastěji 30-34 atomů uhlíku a v  $\omega$ -poloze je hydroxylovaný. Na tuto hydroxylovou skupinu je esterově vázána kyselina linolová.<sup>15</sup> V lidských acylCer se téměř výhradně (>95 %) vyskytuje kyselina linolová, u prasat a morčat se tato kyselina vyskytuje v převážné části (75 % a 84 %), avšak u potkanů a myší klesá její procento na 32 % a 45 % a je nahrazena kyselinou palmitovou.<sup>60</sup> Při deficitu esenciálních mastných kyselin je linolová kyselina v acylCer nahrazována jinou, neesenciální mastnou kyselinou (převážně olejovou), což vede k defektům v kožní bariéře.<sup>39</sup>

AcylCer jsou naprosto nezbytné pro přežití savců na souši. Jejich kompletní deficit není slučitelný se životem, jedinec záhy umírá kvůli obrovským ztrátám vody přes kůži.<sup>16-17</sup> Výkyvy v jejich hladině ve SC (převážně jejich snížené množství) byly nalezeny u několika závažných kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida,<sup>18</sup> lamelární ichtyóza<sup>20</sup> nebo psoriáza.<sup>19</sup>

Jejich důkladnějšímu prozkoumání brání hlavně jejich nedostupnost. Komerčně se zakoupit nedají a jejich izolace ze SC je velmi obtížná, výtěžky této izolace jsou nízké. V literatuře je možné nalézt několik publikací s kompletní syntézou těchto látek,<sup>24-26, 49</sup> avšak syntéza je vždy mnohakroková a poskytuje poměrně malý celkový výtěžek.

#### 3.2.3.1. Biosyntéza acylCer

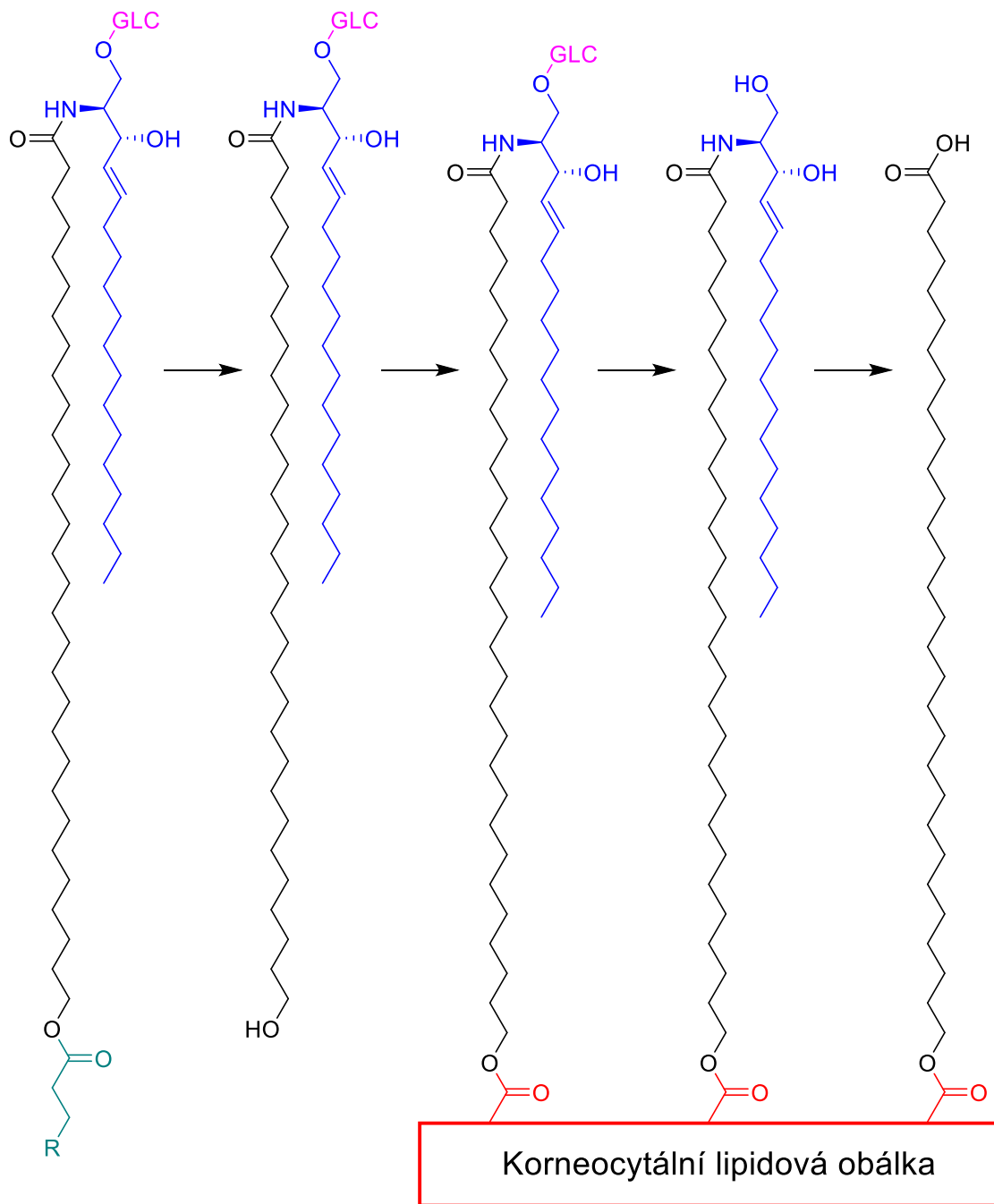
Začátek biosyntézy acylCer je stejný jako u ostatních Cer, dihydrosfingosin vzniká kondenzací palmitoylCoA a L-serinu. Kyselinová část je rovněž tvořena elongací C16 řetězce pomocí elongáz, vždy o 2 uhlíkové atomy, avšak pro tvorbu řetězce >28C je zapotřebí konkrétně elongáza ELOVL4.<sup>21, 61</sup>  $\omega$ -hydroxylace této dlouhé kyseliny probíhá pomocí cytochrom P450 CYP4F22 vázané hydroxylázy<sup>22</sup> a  $\omega$ -esterifikace díky  $\omega$ -acyltransferáze.<sup>23</sup> Pro připojení této kyseliny k dihydrosfingosinu je potřeba enzym z rodiny ceramid syntáz, konkrétně u těchto nejdelších řetězců se uplatňuje CerS3.<sup>16</sup> Nebylo zatím spolehlivě určeno, zda dochází nejprve k omega esterifikaci a až poté k N-acylaci nebo je tomu naopak (Obrázek 6).<sup>39</sup>



Obrázek 6. Biosyntéza acylceramidů

Vzniklé acylCer se ve SC nachází buď volné nebo vázané na korneocyty. Když dojde k terminální diferenciaci keratinocytů na korneocyty, je jejich plazmatická membrána nahrazena takzvanou korneocytální lipidovou obálkou a jejich obsah vyplněn keratinem. Na tuto obálku (převážně na karboxylové skupiny postranních řetězců proteinů jako je involukrin či lorikrin) se pomocí své  $\omega$ -hydroxylové skupiny váží acylCer (Obrázek 7). AcylCer se váží ve formě svého prekurzoru (glukosylCer). Mechanismus prvního kroku není úplně objasněn, může se jednat o oxidativní odštěpení kyseliny linolové dosud neidentifikovaným enzymem, případně o transesterifikační reakci a dochází k vazbě na protein. Glukóza je poté odštěpena pomocí  $\beta$ -glukocerebrosidázy a vzniklý komplex  $\omega$ -hydroxyCer vázaného na korneocyt (případně po odštěpení sfingoidní báze  $\omega$ -hydroxykyseliny) se podílí na tvorbě první lamely v lipidové matrix SC a vytváří tak templát pro budování dalších lamel.<sup>62</sup>





Obrázek 7. Kovalentně vázané ceramidy

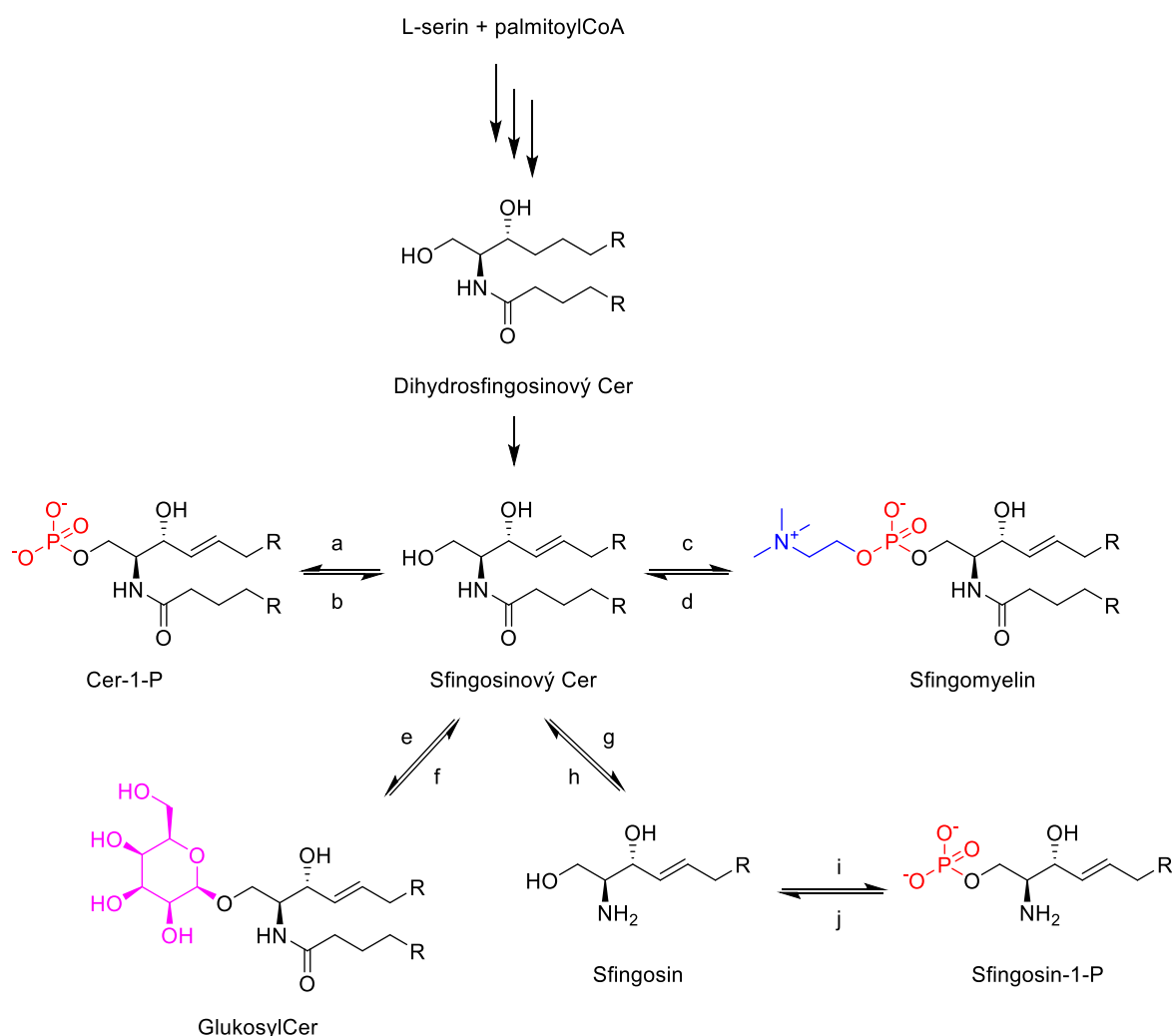
### 3.2.4. Metabolické přeměny ceramidů a dalších sfingolipidů

Cer vznikají v organismu třemi hlavními cestami:

- 1) *De novo* syntéza z L-serinu a palmitoylCoA (viz úvod této práce).

- 2) Hydrolýzou sfingomyelinu pomocí enzymu sfingomyelinázy. Tento enzym má šest isoformů: kyselou, bazickou a čtyři typy neutrální sfingomyelinázy, které se liší umístěním a substrátovou specifitou.<sup>63</sup>
- 3) Zvýšenou hydrolýzou sfingosin-1-fosfátu pomocí enzymu sfingosin-1-fosfát fosfatázy, následovanou acylací sfingosinu na Cer pomocí ceramid syntázy.

Mimo tyto hlavní cesty mohou Cer vznikat hydrolýzou dalších jejich derivátů, například hydrolýzou glukosylceramidů pomocí enzymu  $\beta$ -glukocerebrosidázy, hydrolýzou galaktosylceramidů pomocí  $\beta$ -galaktocerebrosidázy nebo hydrolýzou ceramid-1-fosfátu pomocí ceramid-1-fosfát fosfatázy. Základní metabolické přeměny jsou shrnuty na Obrázku 8.



Obrázek 8. Metabolické přeměny ceramidů na jejich deriváty v lidském organismu. Písmeny jsou popsány enzymy, zodpovědné za danou reakci: a) ceramid kináza b) ceramid-1-fosfát fosfatáza c) sfingomyelin syntáza d) sfingomyelináza e) glukosylceramid syntáza f)  $\beta$ -glukocerebrosidáza g) ceramidáza h) ceramid syntáza i) sfingosin kináza j) sfingosin-1-fosfát fosfatáza

### 3.2.4.1. Ceramid-1-fosfáty (Cer-1-P)

Cer-1-P je jeden z nejjednodušších sfingolipidů, nalezených v biologických membránách a vyskytuje se zde pouze v malém množství.<sup>64</sup> Cer-1-P může vznikat přímo ze sfingomyelinu působením sfingomyelinázy D, avšak taková přeměna byla nalezena pouze u některých bakterií a v pavoučím jedu.<sup>65-66</sup> V savčím organismu však tato cesta nalezena nebyla a Cer-1-P jsou primárně biosyntetizovány z Cer použitím ceramid kináz.<sup>67-68</sup> Receptor pro Cer-1-P nebyl dosud nalezen. Namísto toho působí Cer-1-P přímou interakcí a aktivací cytosolových fosfolipáz, což způsobuje uvolnění arachidonátu a zvýšenou tvorbu prostaglandinů. Zvýšení hladiny prostaglandinu E2 poté vede ke stimulaci zánětlivé reakce v buňkách.<sup>69-70</sup> Cer-1-P také stimuluje buněčnou proliferaci, buněčnou migraci, zvyšuje příjem glukózy a inhibuje apoptózu.<sup>71-74</sup>

### 3.2.4.2. Gangliosidy

Gangliosidy jsou kyselé glykosfingolipidy, které obsahují jeden nebo více zbytků kyseliny sialové a převážně se vyskytují v nervových buňkách.<sup>75</sup> Biosyntéza gangliosidů začíná u Cer. V prvním kroku vzniká glukosylCer působením enzymu glukosylCer syntázy (zvané taky glukosyltransferázy)<sup>76-77</sup> a následně je prodloužen cukerný řetězec na laktosylCer působením galakosyl transferázy.<sup>78</sup> Další vázání monosacharidů, včetně sialových kyselin, probíhá v postupných krocích, až dojde ke vzniku gangliosidu s požadovanou strukturou cukerné složky.<sup>77</sup> Gangliosidy se zapojují do mezibuněčných interakcí a do buněčné signalizace: ovlivňují epidermální růstový faktor,<sup>79</sup> nervový růstový faktor<sup>80</sup> nebo regulují inzulin.<sup>81</sup>

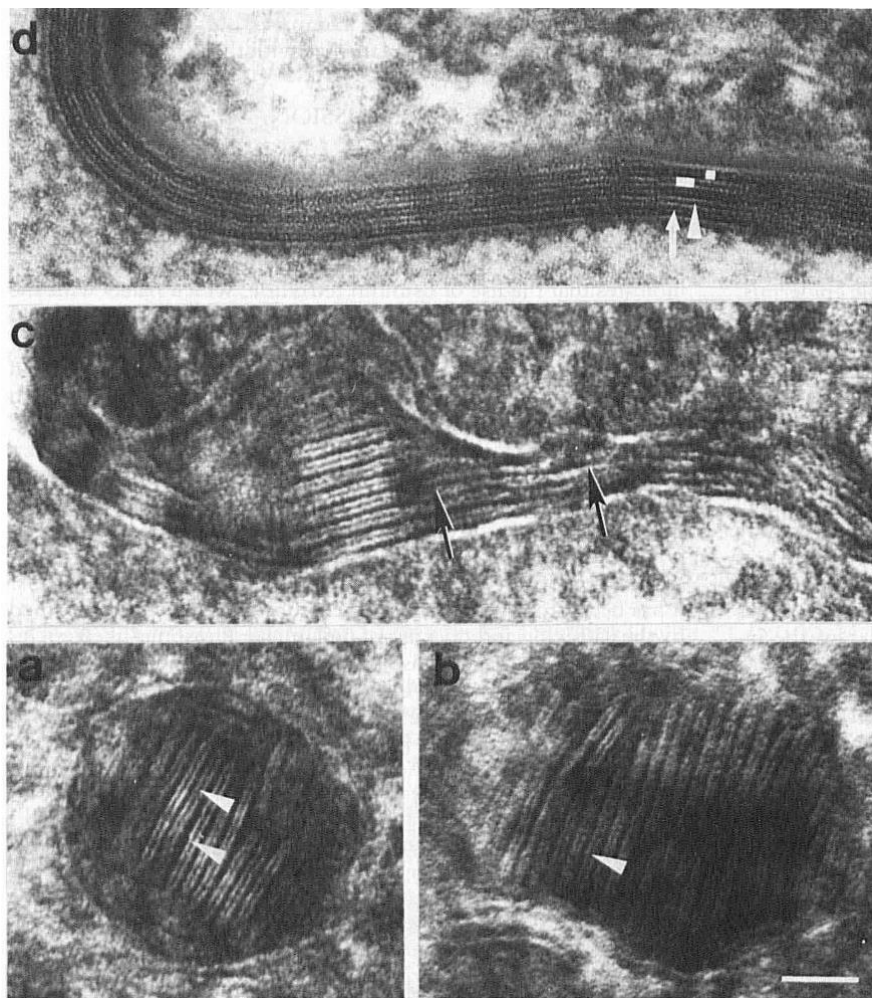
## 3.2.5. Organizace lipidů ve SC

Lipidová matrix SC vykazuje jedinečnou lamelární strukturu. Pohled na organizaci lipidů, tvořících lipidovou matrix, se postupem času měnil a přesná organizace stále není jednoznačně objasněna.

### 3.2.5.1. Lamelární uspořádání

Pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že SC má podobu připomínající strukturu cihel a malty.<sup>82-83</sup> Až když se pro fixaci preparátů začal využívat RuO<sub>4</sub> místo OsO<sub>4</sub> (pro který je potřeba, aby ve zkoumaném materiálu byly nenasycené sloučeniny, které se ve SC příliš nevyskytují), bylo možné spolehlivě pozorovat multivrstevnou lamelární strukturu SC (Obrázek 9). Navíc bylo zjištěno, že tyto vrstvy se střídají pravidelně jako široká-úzká-široká, se šířkou lamely přibližně 12 nm.<sup>13, 84</sup> Tato měření byla později potvrzena pomocí práškové

rentgenové difrakce, kde byla nalezena 11,9 – 13,1 nm šířka lamely, označovaná jako dlouhá periodická fáze (LPP), pro jejíž existenci jsou nezbytné acylCer.<sup>7, 9, 11-14</sup> Mimo tuto LPP byla v lidském SC nalezena ještě další lamelární fáze s kratší periodou (5,3 – 6,4 nm), která dostala název krátká lamelární fáze (SPP).<sup>6-10, 14</sup> Schematicky je lamelární uspořádání popsáno na Obrázku 10.

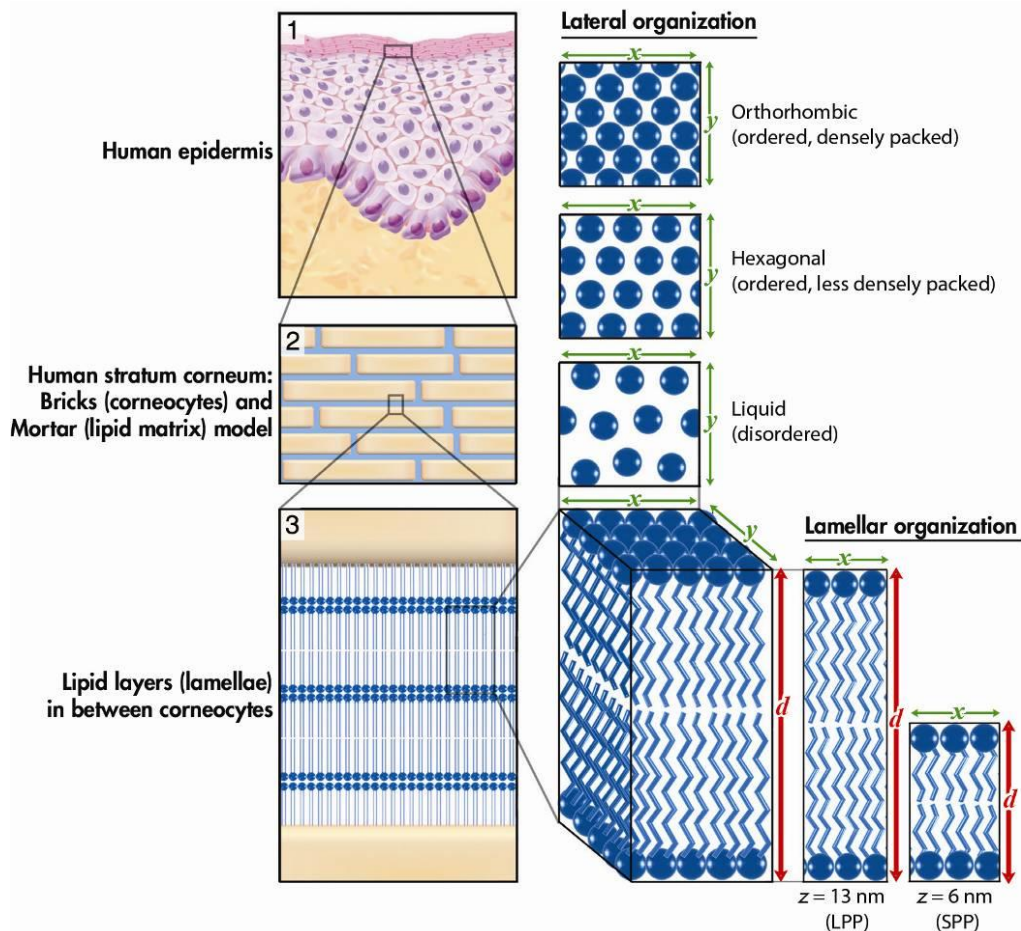


Obrázek 9. Elektronová mikroskopie SC. A a B: lamelární tělíska. C: mezibuněčný prostor mezi SC a stratum granulosum po vylití obsahu lamelárních tělísek. D: mezibuněčný prostor SC<sup>13</sup>

### 3.2.5.2. Laterální uspořádání

V lidském SC převažuje laterální orthorhombické uspořádání, které má nejtěsnější mřížku obdélníkového tvaru a které řetězcům umožňuje pouze minimální pohyb. Méně těsné je hexagonální uspořádání, u kterého již dochází k laterální rotaci řetězců a malá část lipidů ve SC se vyskytuje v kapalně-krytalickém uspořádání, které je již značně neuspořádané (Obrázek 10).<sup>85-86</sup> Mezi nejčastější metody výzkumu laterálního uspořádání slouží

infračervená spektroskopie (s Fourierovou transformací),<sup>87</sup> elektronová difrakce<sup>88</sup> a prášková rentgenová difrakce v oblasti širokých úhlů.<sup>89</sup>



Obrázek 10. Struktura lidského SC a podrobnější popis lamelární a laterální struktury lipidové matrix<sup>90</sup>

### 3.2.5.3. Vznik kožní bariéry

Epidermální bariéra vzniká ve čtyřech základních krocích. V prvním kroku dochází k syntéze lipidů a jejich prekurzorů. Množství syntetizovaných lipidů se postupně zvyšuje s diferenciací keratinocytů. Ve druhém kroku jsou tyto připravené lipidy a jejich prekurzory sbaleny do lamelárních tělísek spolu s katabolickými enzymy, jako jsou lipázy a proteázy. Lamelární tělíska jsou sekretorní orgány, které umožňují transport bariérových lipidů na místo jejich potřeby. Defekty při tvorbě těchto organel způsobují harlekýnskou ichtyózu, nejtěžší formu ichtyózy, která vede k hlubokým defektům v kožní bariéře a její nejtěžší forma není slučitelná se životem.<sup>91</sup> Příčinou těchto defektů je mutace v transportním proteinu ABCA12.<sup>92</sup> Ve třetím kroku jsou lamelární tělíska transportována do nejsvrchnější vrstvy *stratum granulosum*, kde tyto orgány splývají s plazmatickou membránou a jejich obsah se vylévá do prostoru na hranici *stratum granulosum* a SC. Posledním krokem je

přeměna polárních prekurzorů na konečné nepolární lipidy. Takto jsou glukosylCer a sfingomyeliny převedeny na Cer pomocí glukocerebrosidázy nebo sfingomyelinázy a fosfolipidy na mastné kyseliny pomocí fosfolipáz.<sup>39</sup>

### **3.3. Kožní onemocnění se sníženou hladinou acylCer**

U řady kožních onemocnění byla pozorována porušená kožní bariéra. Aby bylo možné zjistit, jak vlastnosti lipidů ovlivňují správnou funkci kožní bariéry, je potřeba znát jejich složení a organizaci (lamelární i laterální) ve SC. Tyto informace nám poté mohou pomoci objasnit mechanismy, podílející se na změně ve složení lipidů, případně jejich organizaci, které následně vedou ke snížené funkci kožní bariéry. Mezi nejčastěji se vyskytující kožní onemocnění patří atopická dermatitida, psoriáza nebo lamelární ichtyóza.

#### **3.3.1. Atopická dermatitida (AD)**

AD je recidivující chronické, zánětlivé onemocnění, které je charakterizováno zarudnutím, vysycháním a svěděním kůže.<sup>93</sup> Postihuje kolem 15 % bělošských dětí a přibližně 2 – 10 % dospělých, ale míra výskytu se stále zvyšuje, převážně v rozvinutých zemích.<sup>94-97</sup> V dnešní době je AD jedním z nejvíce studovaných kožních onemocnění. U pacientů s AD bylo poškození v kožní bariéře nalezeno jak v lézích, tak i mimo ně, s různým stupněm závažnosti.<sup>18, 98-99</sup> Příčina vzniku AD dosud nebyla přesně objasněna. Jednou z příčin je genetická predispozice při mutaci v genu pro filaggrin, avšak roli hraje i imunologie a vlivy z okolí.<sup>100-102</sup> V poslední době se rovněž ukazuje, že AD přispívá k rozvoji alergií nebo astmatu.<sup>103</sup>

U pacientů s AD bylo nalezeno snížené celkové množství lipidů ve SC. Z Cer byly pozorovány největší změny u Cer EOS a Cer NP, které byly detekovány v signifikantně nižším množství. Naopak došlo k relativnímu nárůstu množství Cer NS, AS a AP.<sup>104-107</sup> Rovněž bylo nalezeno mnohem vyšší množství Cer a mastných kyselin se zkrácenými řetězci. U kyselin převažovala délka 16 – 18C, namísto zdravých jedinců, kde převažují kyseliny s 24 – 26C a bylo nalezeno signifikantně zvýšené množství polynenasycených kyselin, což může naznačovat přítomnost zánětu nebo mikrobiální aktivity.<sup>108-110</sup>

Zkracování délky řetězců Cer a mastných kyselin u AD vede ke snížení mezirovinné vzdálenosti v LPP a ke zhoršení tvorby LPP, což se projevuje negativně na bariérovou funkci kůže.<sup>9, 111</sup> Snížené množství acylCer nevede pouze ke zhoršení tvorby LPP, ale i laterální organizace je zasažena: Bylo pozorováno zvýšené množství hexagonálního uspořádání lipidů na úkor orthorhombického.<sup>112</sup>

### 3.3.2. Psoriáza

Psoriáza je chronické zánětlivé onemocnění kůže, které je charakterizováno nadměrnou epidermální proliferací a nekompletní diferenciací buněk. V západních zemích je tímto onemocněním postiženo okolo 2 % lidí. Příčina psoriázy také není jednoznačně prokázána, pravděpodobně se jedná o imunologickou poruchu, avšak možné jsou i další příčiny.<sup>113-115</sup>

Při analýze lipidů SC u pacientů s psoriázou bylo nalezeno snížené množství Cer EOS, NP a AP, zatímco Cer AS a NS byly nalezeny ve větším množství oproti zdravým jedincům. Bylo pozorováno i částečné zkrácení řetězců lipidů. Tato změna ve složení vede ke zvýšeným ztrátám vody přes kůži: v místech pokrytých šupinatou kůží je tato ztráta zvýšena 2 – 3 krát, po odstranění šupin je zvýšena dokonce 6 krát.<sup>19</sup> V lamelární organizaci kůže bez lézí nebyla nalezena žádná změna oproti zdravé kůži, ale v místě lézí dochází k redukci přítomnosti LPP, případně až jejímu vymizení.

### 3.3.3. Lamelární ichtyóza (LI)

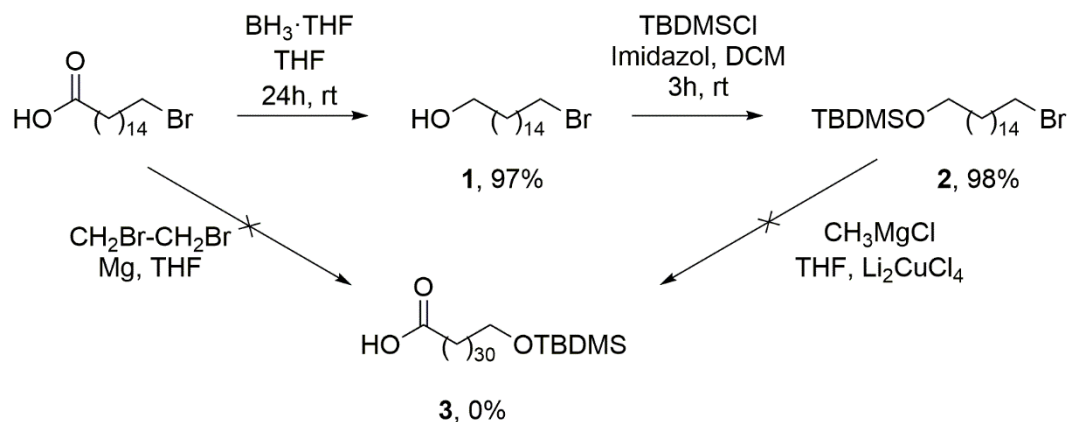
LI je autosomálně recesivní porucha (absence enzymu transglutaminázy 1), která se vyskytuje u přibližně 1 člověka z 600 tisíc a je viditelná hned po porodu (děti se rodí jako takzvané kolodiové děti a jsou po porodu pokryté vrstvou, připomínající vazelinu) a zůstává po celý život. Průvodním jevem je šupinatění kůže, způsobené hyperkeratinózou, které se s přibývajícím věkem soustředí do oblastí kloubů.<sup>116-117</sup>

Ve složení lipidů u LI bylo nalezeno snížené množství Cer EOS a NP<sup>20</sup> a zároveň snížený poměr mastných kyselin k cholesterolu a mastných kyselin k celkovým Cer, což naznačuje snížené množství volných mastných kyselin ve SC.<sup>118</sup> V lamelárním a laterálním uspořádání byly rovněž nalezeny změny: Došlo ke zkrácení lamelárních fází a více lipidů se uspořádává do méně těsného, hexagonálního uspořádání na úkor orthorhombického, což snižuje funkci kožní bariéry.<sup>119</sup>





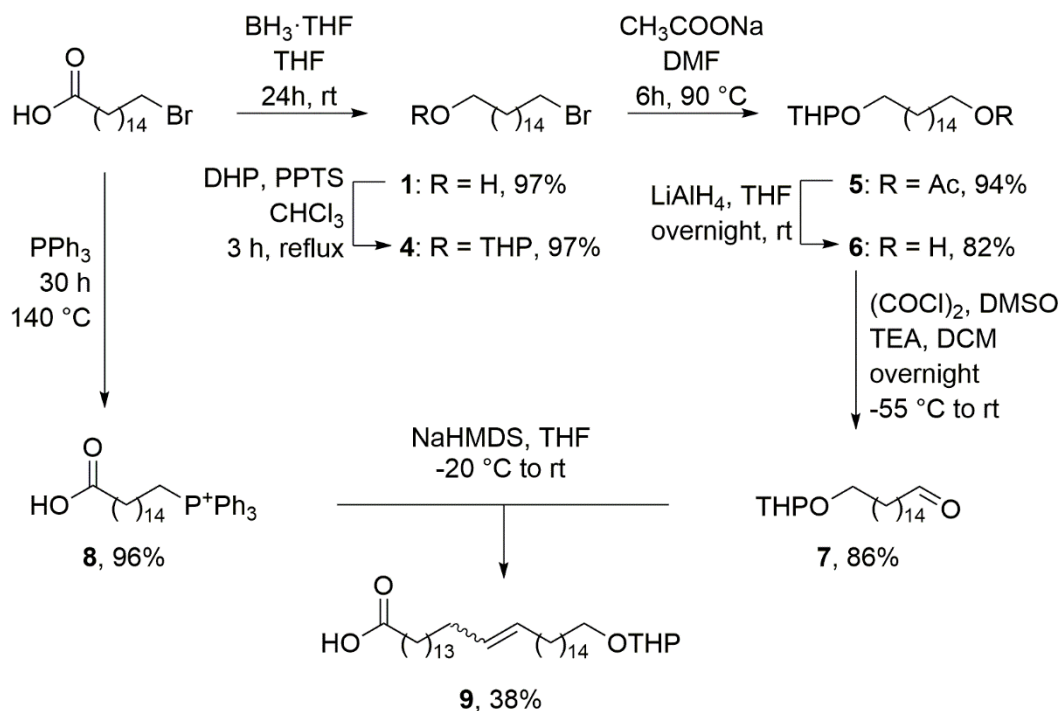
z chráněného bromalkoholu) rovněž nevedla k pozitivnímu výsledku. V literatuře je tato reakce popsána do maximální délky 24C vznikajícího řetězce.<sup>123-125</sup>



Obrázek 12. Neúspěšná příprava C32 řetězce pomocí reakce Grignardovy sloučeniny v přítomnosti  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$

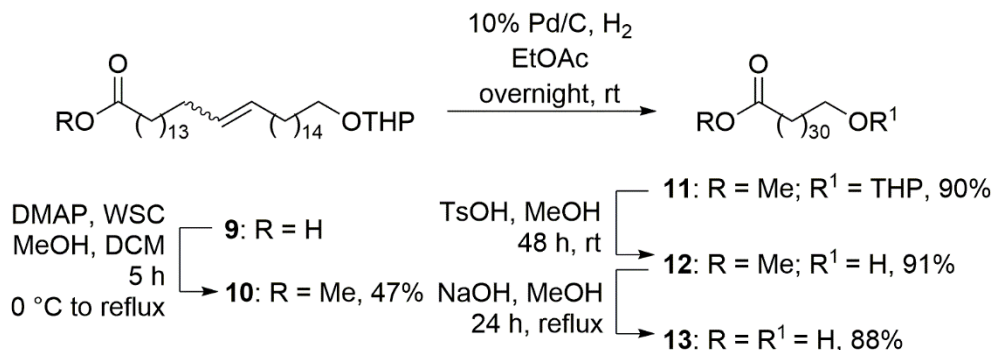
Jelikož v minulosti byla využita k tvorbě ultra-dlouhých řetězců Wittigova reakce,<sup>24-25</sup> použili jsme tento přístup také. Začátek syntetického postupu byl obdobný – redukce 16-bromohexadekanové kyseliny na alkohol **1** a následné ochránění (v tomto případě pomocí THP skupiny). Přímá substituce bromu v chráněném alkoholu **4** za hydroxylovou skupinu se jeví jako jednoduchá reakce, nicméně ani po dlouhém zahřívání v 2M roztoku NaOH nedocházelo k reakci. Proto jsme zvolili jiný přístup, chráněný alkohol **4** byl převeden na ester **5**, který byl následně zredukován na alkohol **6** s vysokým výtěžkem a při použití mírných reakčních podmínek. Nejvýhodnějším způsobem oxidace alkoholu **6** na aldehyd **7** se ukázala být Swernova oxidace,<sup>126-127</sup> která dosahovala 86 % výtěžku. Dess-Martinova oxidace,<sup>128</sup> případně použití pyridinium chlorochromátu vedlo k nižším výtěžkům (55 % a 50 %).

Druhý reaktant pro Wittigovu reakci (fosfoniová sůl **8**) byl získán přímou kondenzací výchozí kyseliny s trifenylfosfinem bez přítomnosti rozpouštědla (v tavenině). Wittigova reakce byla klíčová pro tvorbu 32C kyseliny, avšak i přes mnoho pokusů o optimalizaci se nepodařilo získat vyšší výtěžek než 38 % (Obrázek 13).



Obrázek 13. Příprava C32 řetězce využitím Wittigovy reakce

Nízký výtěžek byl v tomto případě způsoben nízkou rozpustností 16C výchozích látek **7** a **8**. Pokus o záměnu silné báze za jinou (NaH, LiHMDS nebo LDA) vedl ke stejnému nebo nižšímu výtěžku; pokus o chránění karboxylové skupiny vedl k voskovitým, složitě čistitelným látkám, které způsobovaly ještě nižší výtěžek Wittigovy reakce. Podobně se pokoušeli v roce 2012 Tashiro a Mori o přípravu C30 řetězce s využitím Grubbsovy metateze, avšak výtěžek dosahoval pouze 45 %.<sup>26</sup> My jsme však usoudili, že syntéza molekul **7** a **8** není příliš náročná ani ve větším měřítku, proto jsme pokládali tento výtěžek v začátku syntézy za uspokojivý.



Obrázek 14. Syntéza 32-hydroxydotriakontanóvé kyseliny

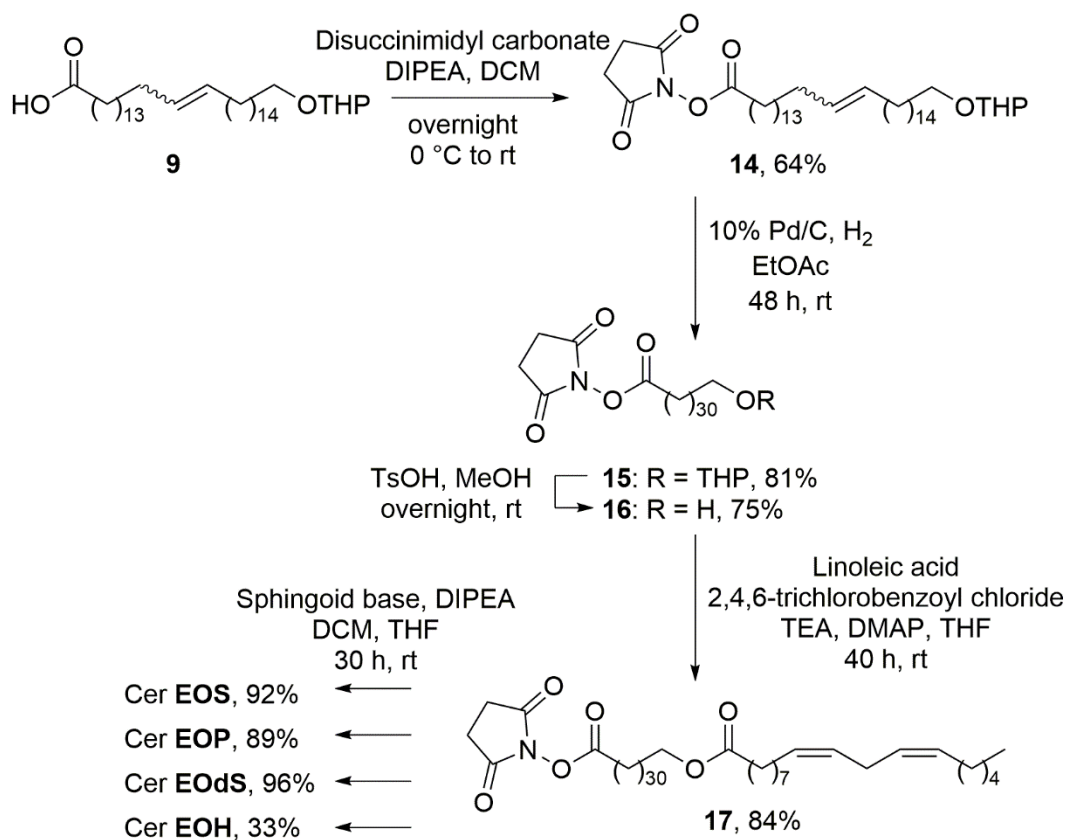
Získané E/Z izomery nenasycené kyseliny **9** nebyly oddělovány, protože následovala hydrogenační reakce. Přímá hydrogenace kyseliny **9** neprobíhala kvůli nízké rozpustnosti,

bylo potřeba karboxylovou skupinu ochránit. Jako první volba byl zvolen *tert*-butyldimethylsilyl ester, protože tato skupina se velmi snadno zavádí a následně je jednoduché ji odstranit. Avšak výtěžky reakce se pohybovaly pouze kolem 20 %, protože tato skupina se ukázala být až příliš nestabilní a docházelo k samovolnému odštěpování a opětovnému snížení rozpustnosti při hydrogenaci. Proto byl jako chránící skupina zvolen methyl ester. Nejvhodnější způsob, jak připravit methyl ester **10** se ukázala být reakce s ve vodě rozpustným karbodiimidem (WSC; *N*-(3-(dimethylamino)propyl)-*N'*-ethylkarbodiimid), která poskytovala 47 % výtěžek. Prodloužení reakčního času vedlo k rozkladu esteru **10**. Ostatní pokusy o přípravu tohoto esteru vedly k nižším výtěžkům nebo neprobíhaly vůbec. Esterifikaci v kyselém prostředí nebylo možné využít, protože docházelo k rozkladu THP chránící skupiny. Methylace pomocí methyliodidu nebo dimethyl sulfátu v přítomnosti báze vedla k nízkým výtěžkům (5 % a 15 %) a to i po prodloužení reakčního času nebo zvýšení reakční teploty. Velmi elegantním způsobem se ukázala být reakce s použitím diazomethanu, která poskytovala produkt v poměrně krátkém čase s výtěžkem přes 50 %, avšak limitujícím faktorem byla kapacita generátoru na vyvíjení diazomethanu, která nedostačovala při reakci ve větším množství.

Následná katalytická hydrogenace na Pd/C katalyzátoru poskytla produkt **11** ve vysokém výtěžku (přes 90 %). Odstranění THP skupiny v kyselém prostředí probíhalo opět s vysokým výtěžkem a pro dočištění produktu postačovala krystalizace ze směsi CHCl<sub>3</sub>/MeOH. Závěrečným krokem pro přípravu 32-hydroxydotriakontanové kyseliny **13** bylo bazické odštěpení methylové skupiny v methanolickém roztoku NaOH (Obrázek 14). Získaná kyselina **13** se rovněž vyskytuje ve SC, je navázána na glutamátové konce involukrinu (případně podobných bílkovin) přes svou  $\omega$ -hydroxylovou skupinu a podílí se na tvorbě korneocytální lipidové obálky.<sup>122</sup>

Původní plán byl pokračovat v syntéze acylCer z této kyseliny **13**. Nicméně se ukázalo, že je prakticky nemožné tuto kyselinu použít pro další reakce, případně ji převést na vhodný derivát, díky její nerozpustnosti v téměř jakémkoliv rozpouštědle a díky její velmi nízké reaktivitě. Proto jsme hledali jinou vhodnou chránící skupinu, kterou by bylo možné zavést již dříve v syntetickém postupu, která by potenciálně zvýšila rozpustnost kyseliny **13** a která by případně vznikala ve vyšším výtěžku než zmíněný methyl ester. Předpokládali jsme, že by bylo možné využít sukcinimidylesterovou skupinu, která se běžně používá pro aktivaci karboxylu při *N*-acylační reakci,<sup>129</sup> mohla by být dostatečně stabilní ve všech následujících reakcích a v závěrečném kroku by posloužila k tvorbě amidové vazby. Nejvhodnější místo pro vnesení sukcinimidylové skupiny do molekuly se ukázalo být po Wittigově reakci, tj. ochránit produkt **9** za vzniku produktu **14**. Pokusili jsme se vnést tuto skupinu do molekuly i v jiném kroku syntézy, avšak bez většího vlivu na výtěžek celkového postupu.

Nejvhodnějším způsobem tvorby sukcinimidylesteru se ukázala být reakce s disukcinimidylkarbonátem, která poskytuje výtěžky kolem 64 % ve velkém množství reaktantů (v množství reaktantů do 100 mg je možné výtěžek zvýšit až na 80 %). Reakce s *N*-hydroxy sukcinimidem v přítomnosti WSC poskytovala nižší výtěžky produktu **14**. Hydrogenace **14** na produkt **15** probíhala bez rozkladu sukcinimidylesterové skupiny s výtěžkem přes 80 % ve velkém množství, v množství do 100 mg je výtěžek přes 90 %. Poměr výchozí látky a produktu při této reakci byl monitorován pomocí  $^1\text{H}$  NMR, protože  $R_f$  hodnota se během reakce nemění. THP skupina byla odstraněna v kyselém prostředí za vzniku prekursoru **16**.



Obrázek 15. Syntéza cílových acylCer EOS, EOP, EOdS and EOH

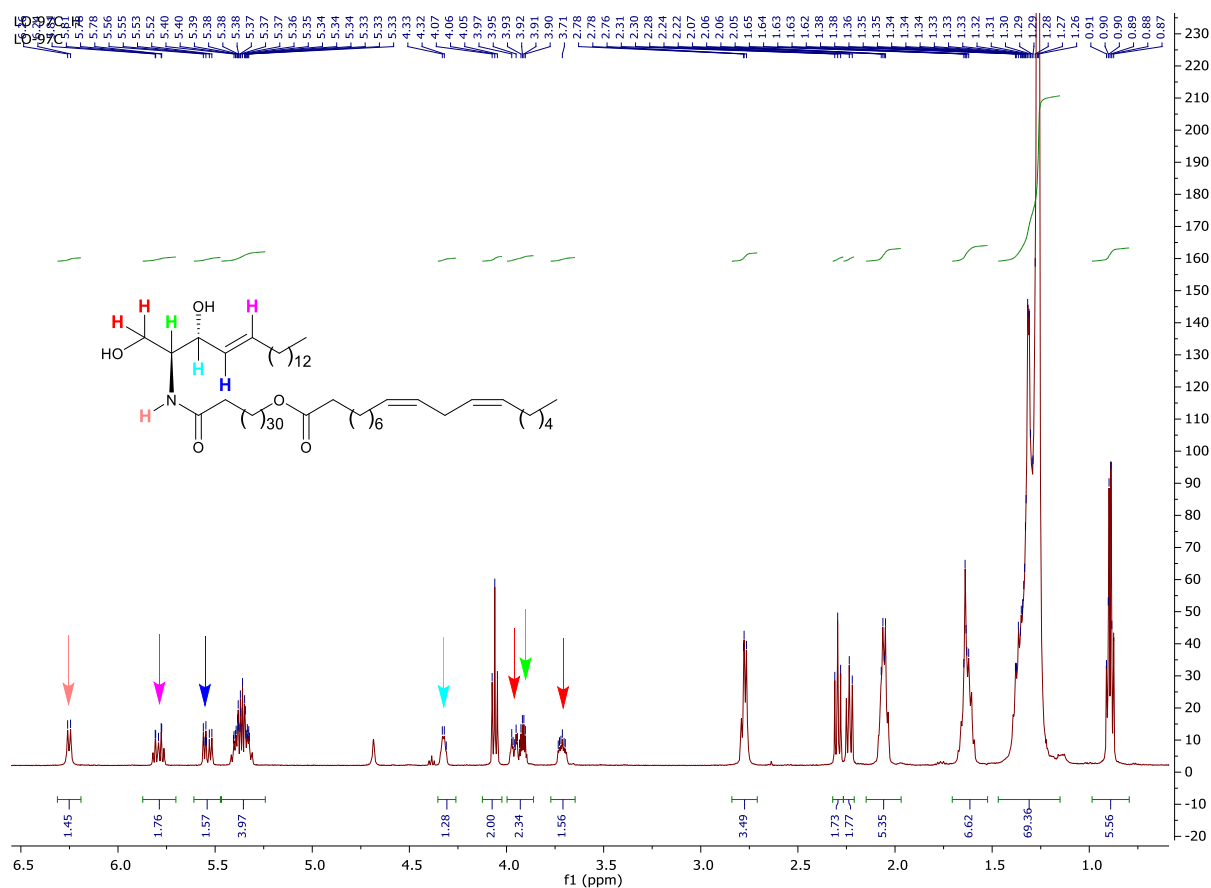
Dalším krokem bylo navázání linolové kyseliny na volnou  $\omega$ -hydroxylovou skupinu prekursoru **16**. Navázání linolové kyseliny před acylací sfingoidní báze, bylo zvoleno proto, aby se předešlo nutnosti chránit sfingoidní bázi, což zvyšuje počet kroků a snižuje celkový výtěžek.<sup>26, 130</sup> Tento krok, vedoucí k diesteru **17** se ukázal být překvapivě náročným. Mnoho reakčních podmínek bylo vyzkoušeno bez úspěchu: reakce s linoleoyl chloridem, reakce s linolovou kyselinou v přítomnosti WSC, Mitsunobuova reakce,<sup>131</sup> reakce v iontových krystalech<sup>132</sup> nebo aktivace pomocí 2-chloro-1-methylpyridinium iodidu.<sup>25</sup> Nakonec se tato reakce podařila za podmínek Yamaguchiho esterifikační reakce a produkt **17** vznikl

s výtěžkem více než 80 %.<sup>133</sup> Sloučenina **17** poté sloužila jako prekurzor pro přípravu všech lidských acylCer. **Cer EOS**, **Cer EOP**, **Cer EOdS** a **Cer EOH** byly získány přímou reakcí prekurzoru **17** s příslušnou sfingoidní bází v přítomnosti diisopropylethyl aminu s výtěžky nad 90 %, což je vyšší výtěžek než dříve publikované výtěžky v literatuře (využití *p*-nitrofenyl esteru<sup>134</sup> nebo EEDQ<sup>25</sup>). Jedinou výjimkou byl **Cer EOH**, který jsme získali ve výtěžku 33 %, kvůli nestabilitě výchozího 6-hydroxysfingosinu (Obrázek 15).

## 4.2. Potvrzení struktury polární hlavy acylCer s použitím 2D NMR analýzy

V případě polární hlavy Cer není dostačující <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektrum pro přesné určení jejich struktury. Z tohoto důvodu byly měřeny ještě 2D spektra, konkrétně DQCOSY (korelace H na H) a HSQC (korelace H na C). Pomocí těchto metod bylo možné konkrétně přiřadit veškeré atomy vodíku v polární hlavě Cer.

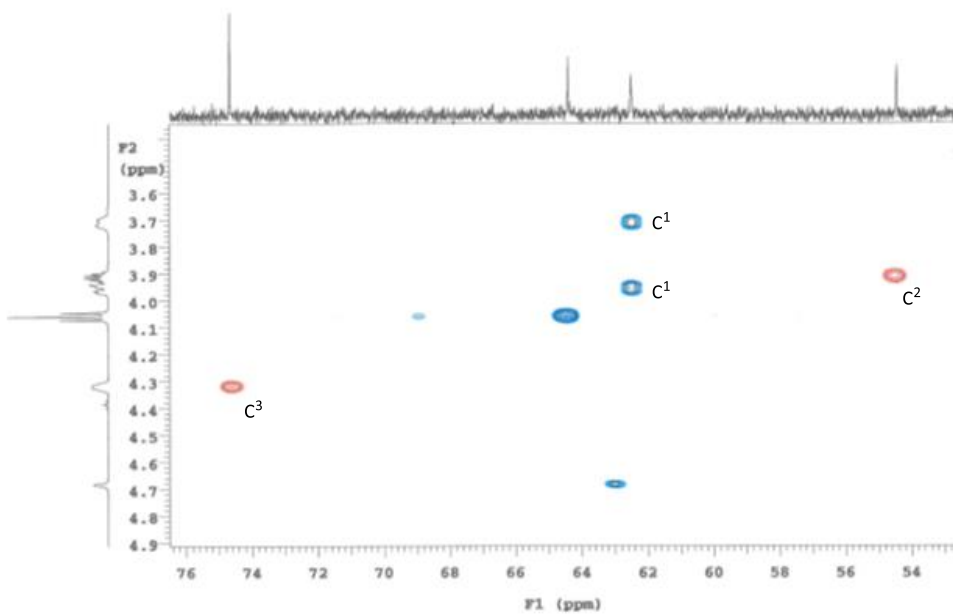
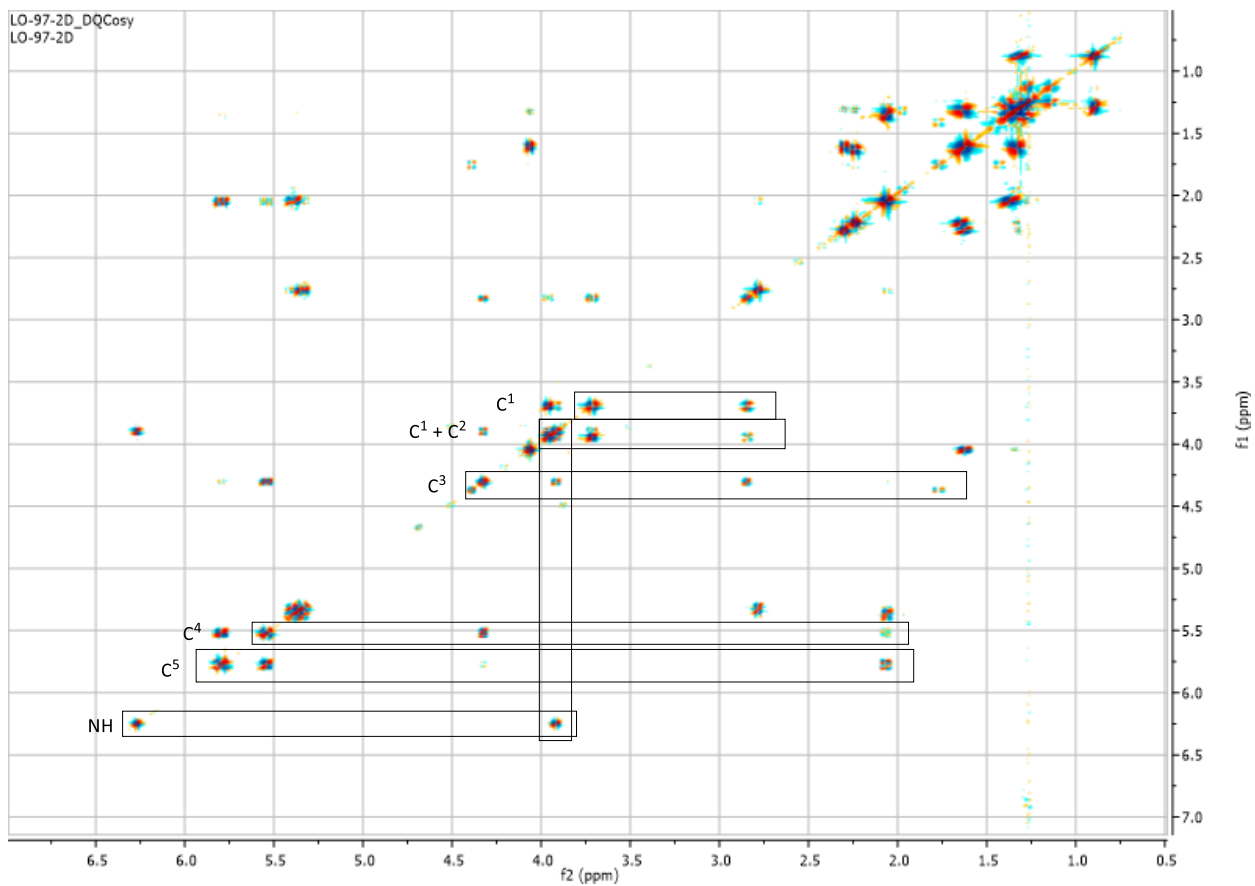
## 4.2.1. Cer EOS



Obrázek 16. <sup>1</sup>H NMR spektrum Cer EOS

Vodík skupiny *NH* tvoří vždy charakteristický dublet v oblasti  $\delta$  6,25 – 6,5 ppm a od něj je pomocí DQCOSY spektra možné určit vodík na *CH-NH* skupině. Vodíky na dvojně vazbě v Cer hlavě je možné rozlišit opět na základě DQCOSY. Mají vzájemně na sebe korelaci, avšak vodík na C<sup>5</sup> má pouze korelaci na alkylový řetězec a vodík na C<sup>4</sup> má korelaci i k vodíku na C<sup>3</sup> v polární hlavě. Vodíky na C<sup>1</sup> byly určeny podle HSQC, jakožto dva vodíky náležející stejnému atomu uhlíku. Poslední zbývající atom vodíku v polární hlavě, vázaný na C<sup>3</sup> byl určen jako zbývající atom H na HSQC spektru.

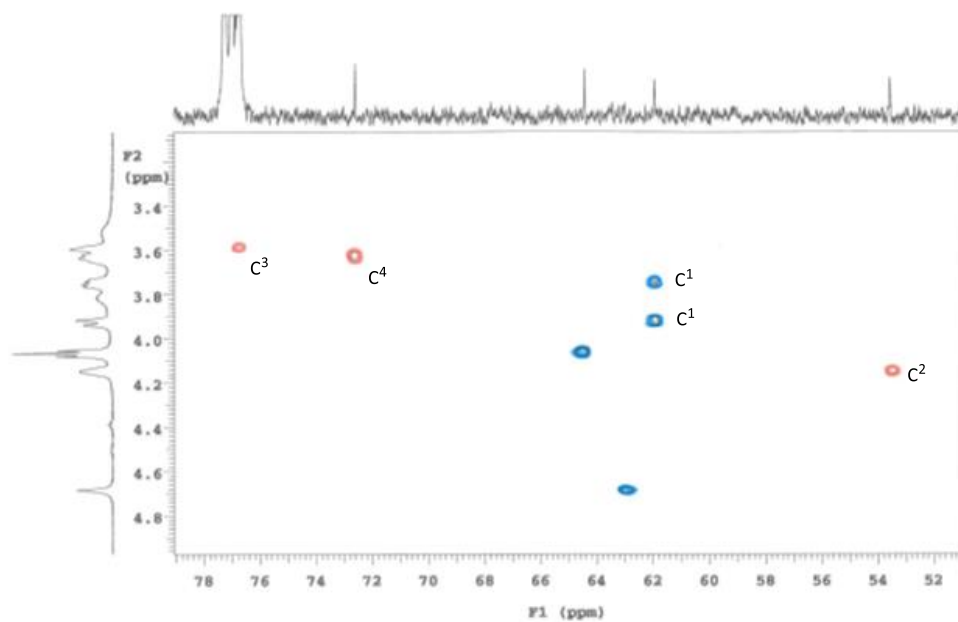
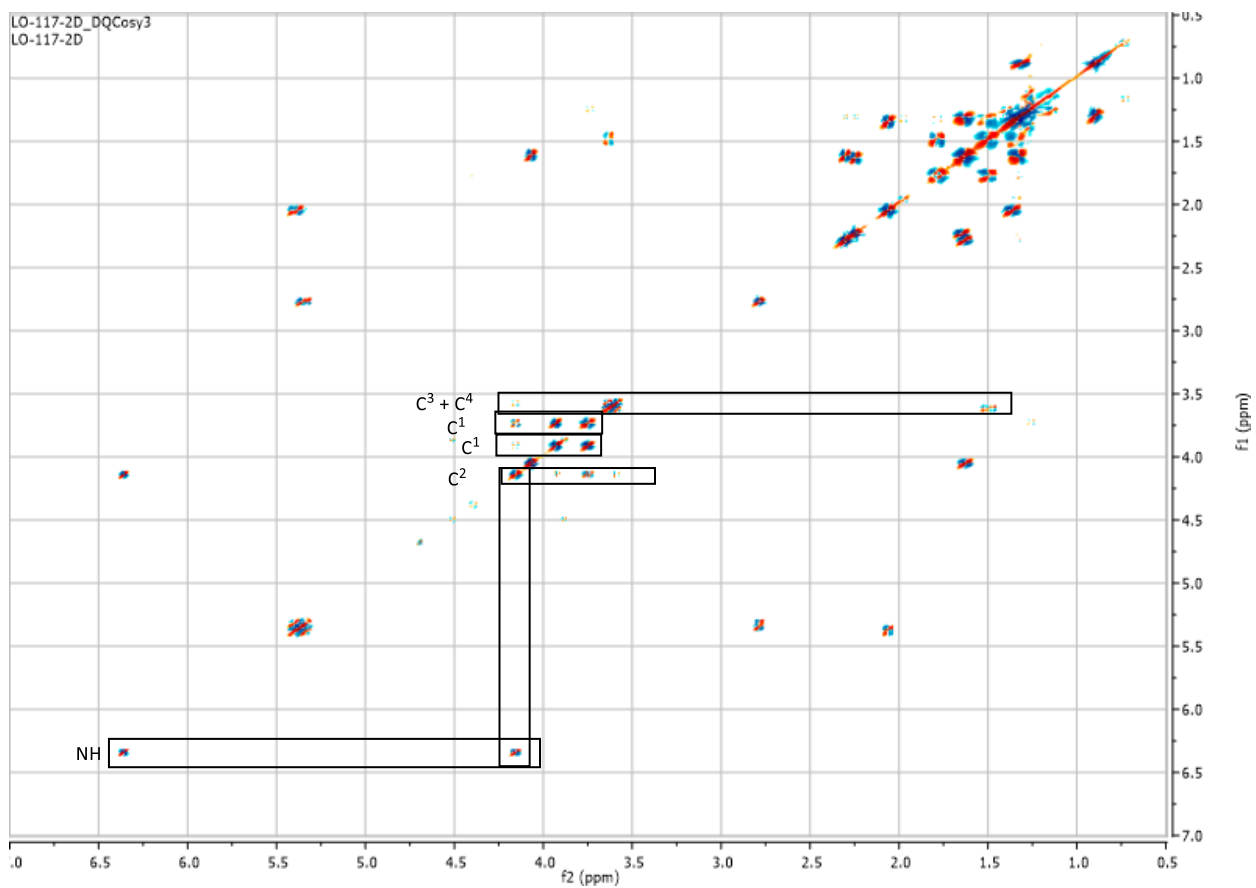
Atomy vodíku na dvojně vazbě kyseliny linolové vždy tvoří charakteristický multiplet v oblasti  $\delta$  5,25 – 5,5 ppm a čistý triplet v oblasti  $\delta$  4 – 4,2 ppm odpovídá *CH*<sub>2</sub> skupině vázané na esterový atom kyslíku. Tyto signály ve spektrech nejsou vyznačeny. Signály pod  $\delta$  3 ppm odpovídají vodíkovým atomům v uhlovodíkových řetězcích.



Obrázek 17. DQCOSY spectrum (nahore) a HSQC spectrum (dole) Cer EOS

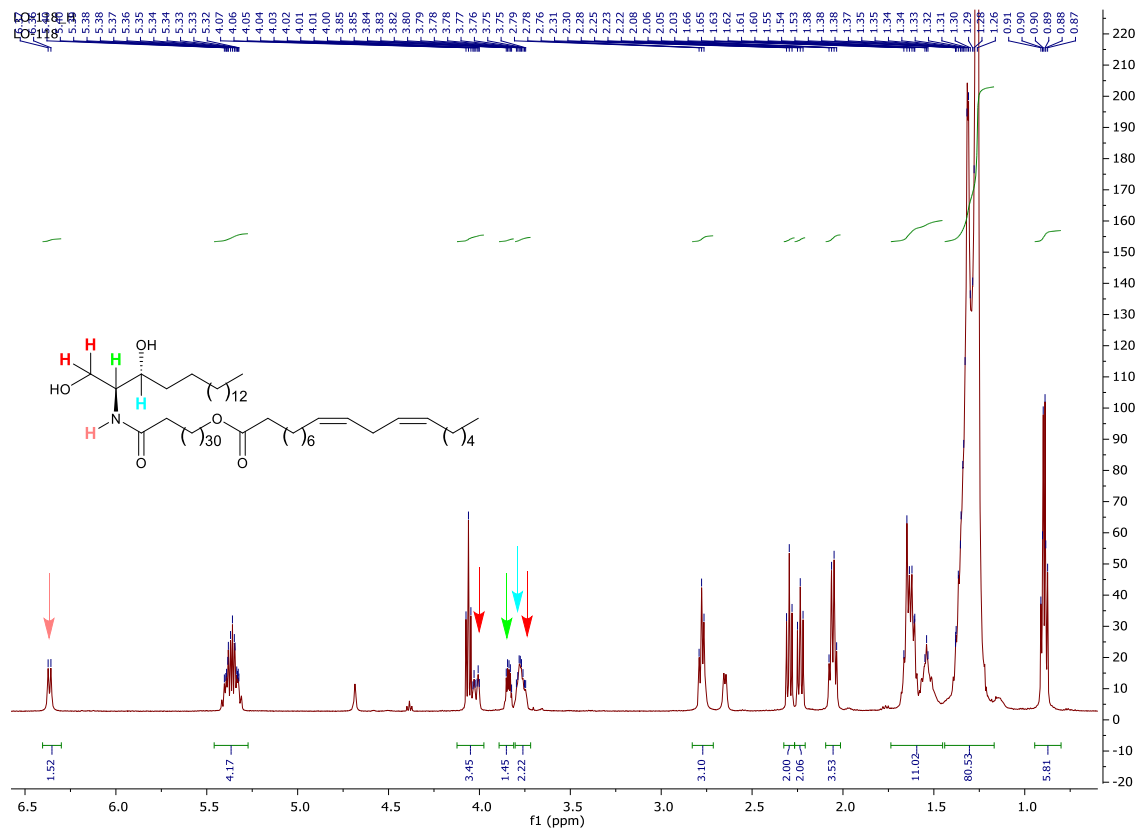






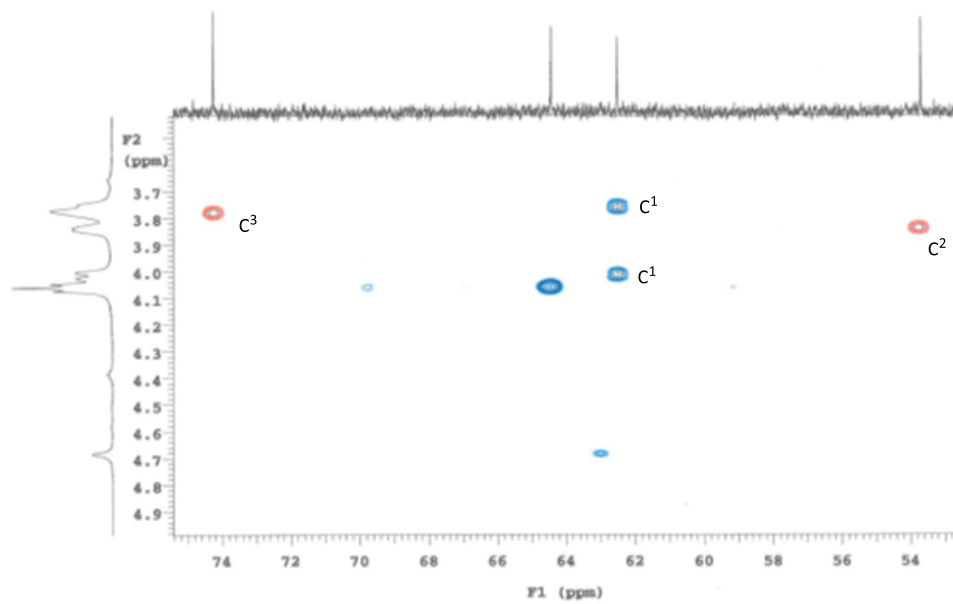
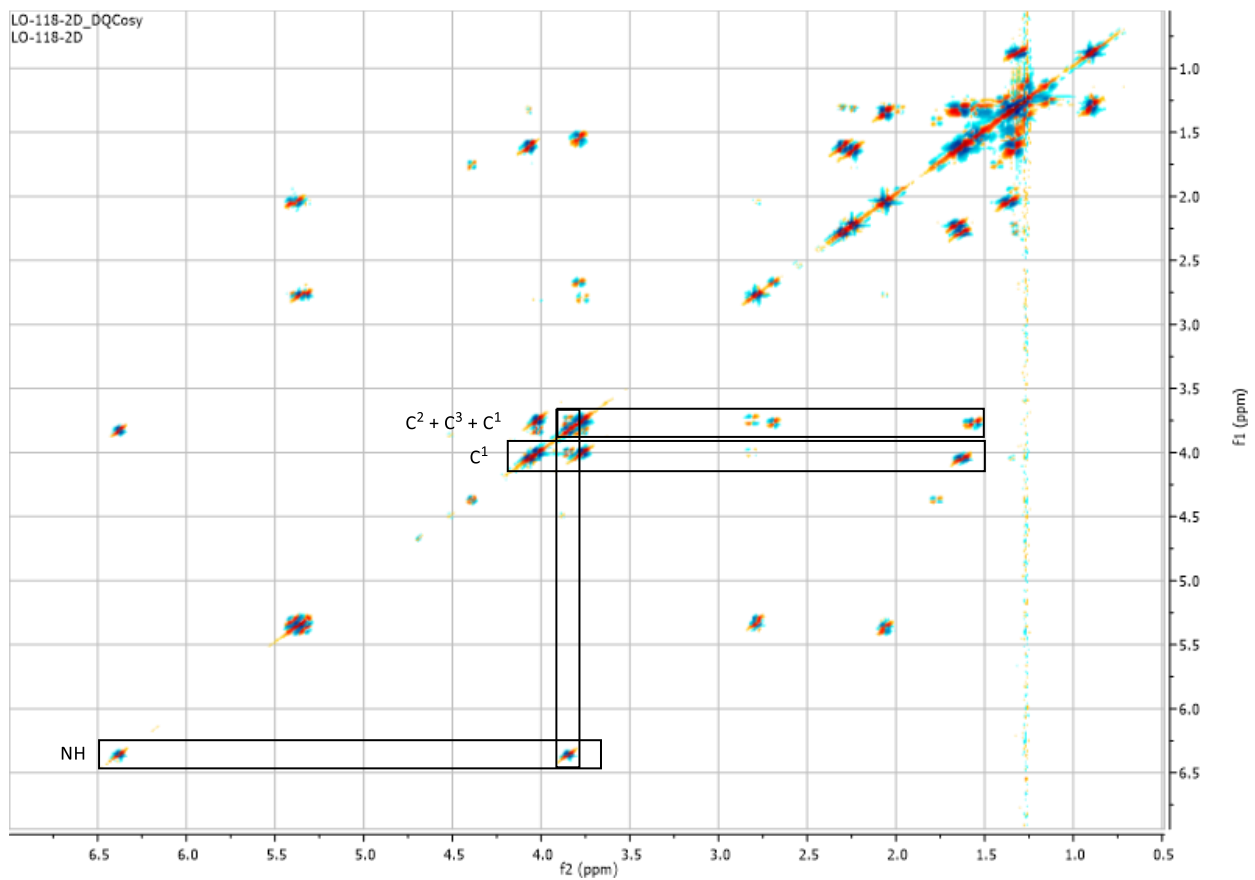
Obrázek 19. DQCOSY spectrum (nahore) a HSQC spectrum (dole) Cer EOP

### 4.2.3. Cer EODs



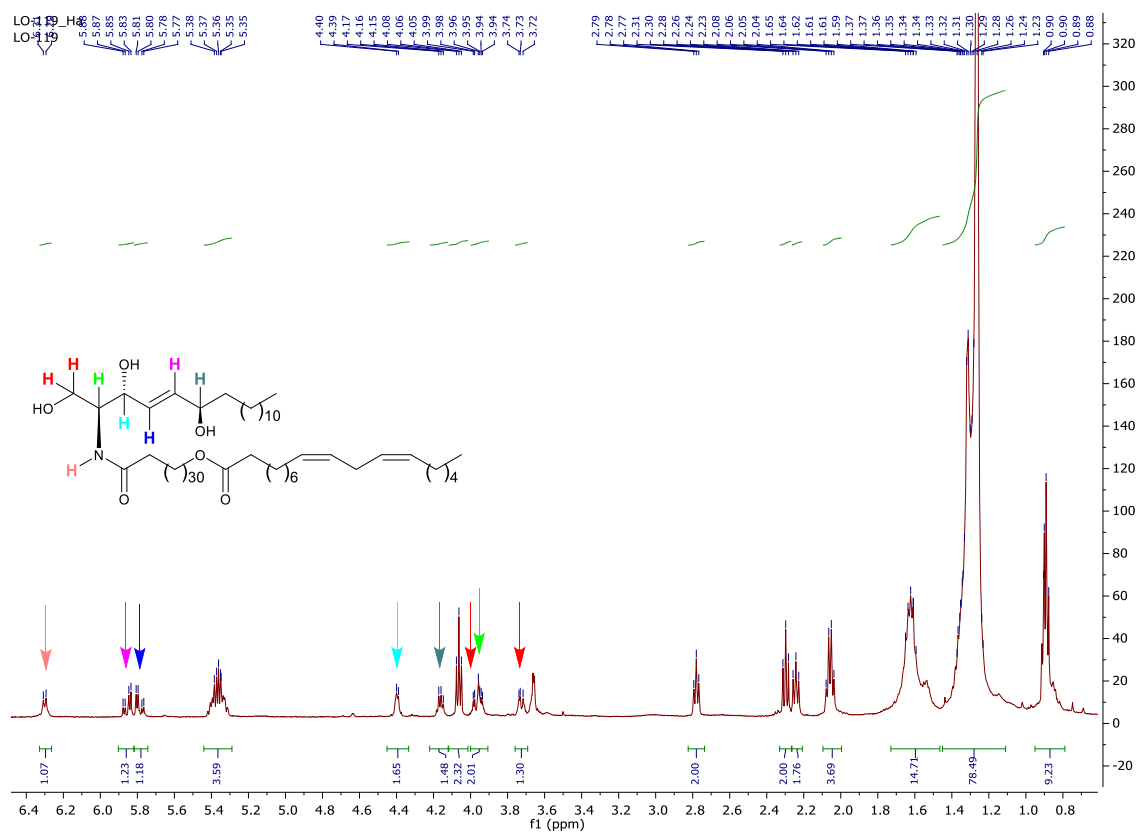
Obrázek 20. <sup>1</sup>H NMR spektrum Cer EODs

Cer EODs má ze všech podtříd acylCer nejjednodušší polární hlavu, která neobsahuje ani dvojnou vazbu ani další OH skupinu, avšak v <sup>1</sup>H a DQCOSY NMR spektru se signály hodně překrývají. Vodíky na C<sup>1</sup> byly určeny podle HSQC, tudíž zbývají pouze dva vodíky na C<sup>2</sup> a C<sup>3</sup>. V tomto případě byl vodík na C<sup>2</sup> určen podle HSQC jako signál s  $\delta$  okolo 54 na <sup>13</sup>C uhlíkovém spektru a zbývající vodík byl přiřazen na C<sup>3</sup>.



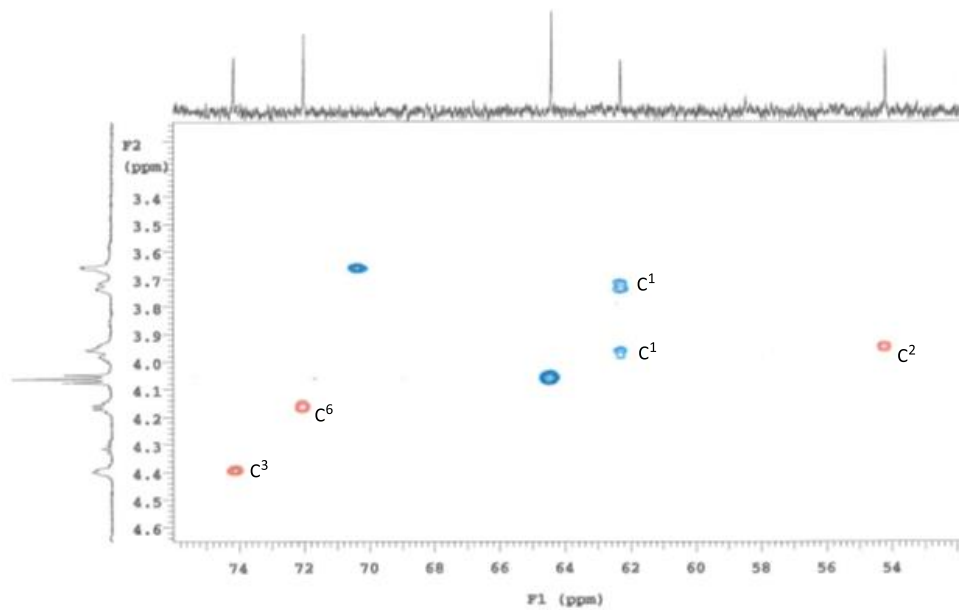
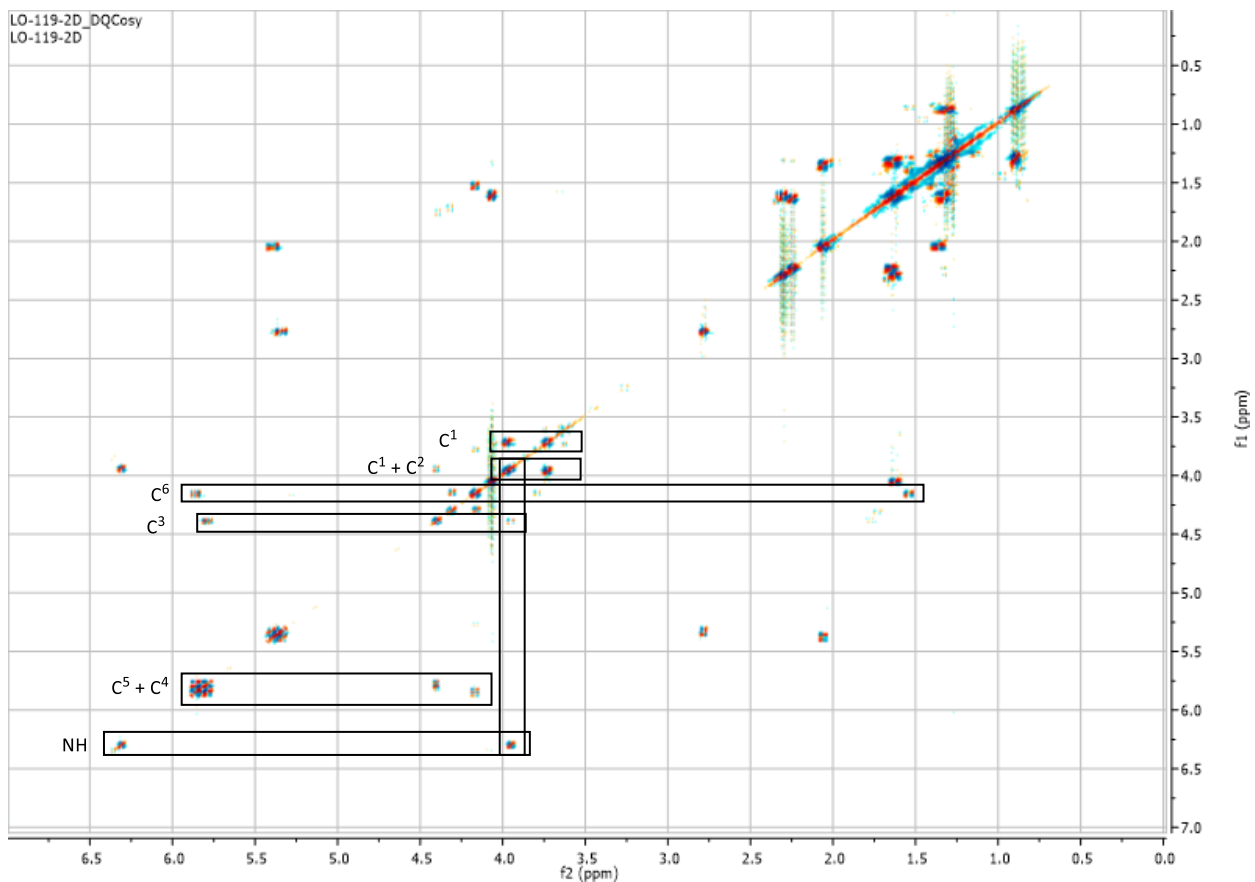
Obrázek 21. DQCOSY spectrum (nahore) a HSQC spectrum (dole) Cer EODs

#### 4.2.4. Cer EOH



Obrázek 22.  $^1\text{H}$  NMR spektrum Cer EOH

Cer EOH má nejsložitější strukturu polární hlavy, která v tomto případě obsahuje jak dvojnou vazbu, tak i další OH skupinu na C<sup>6</sup>. Vodíky na C<sup>1</sup> byly určeny podle HSQC, stejně tak i vodík na C<sup>2</sup> (podle dříve zmíněných charakteristických vlastností). Uhlíky na C<sup>3</sup> a C<sup>6</sup> byly rozlišeny podle DQCOSY spekter, vodík na C<sup>3</sup> má slabou korelaci na vodík na C<sup>2</sup> a vodík na C<sup>6</sup> má korelaci na alkylový řetězec. Na základě určené polohy vodíků na C<sup>3</sup> a C<sup>6</sup> lze rozlišit i vodíky na C<sup>4</sup> a C<sup>5</sup> podle jejich korelace k příslušným sousedícím vodíkům v DQCOSY spektru.

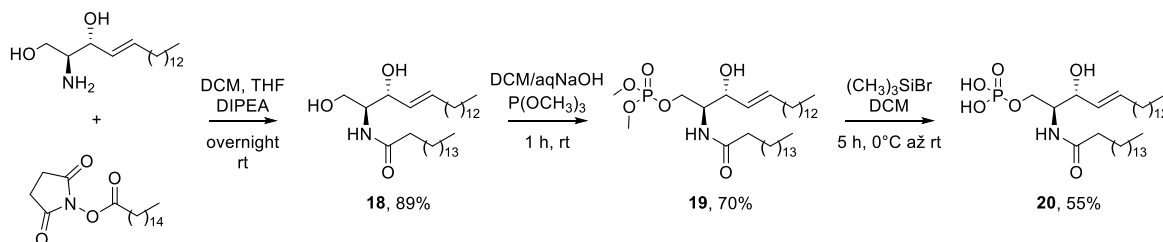


Obrázek 23. DQCOSY spectrum (nahore) a HSQC spectrum (dole) Cer EOH

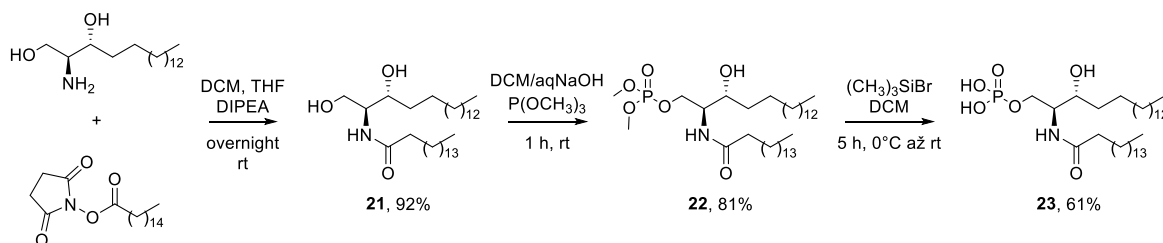
### 4.3. Syntéza Cer-1-P

Syntéza vycházela z požadované sfingoidní báze (sfingosin nebo dihydrosfingosin), která byla v prvním kroku acylována sukcinimidylesterem palmitové kyseliny za vzniku Cer **18** a **21** ve vysokém výtěžku (89 % a 92 %). Acyl kyseliny palmitové byl zvolen záměrně s ohledem na budoucí experimenty s buněčnou signalizací. Nejlepších výtěžků fosforylace bylo dosaženo pomocí mezifázové katalýzy v systému  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{aqNaOH}$  s použitím  $\text{P}(\text{OCH}_3)_3$  jako fosforylačního činidla, cetylpyridinium bromidu, jako mezifázového katalyzátoru a  $\text{CCl}_2\text{Br}-\text{CCl}_2\text{Br}$  jako zdroje halogenu.<sup>135</sup> Tímto postupem jsme získali dimethylester Cer-1-P **19** (s výtěžkem 70 %) a **22** (s výtěžkem 81 %). Posledním krokem byla hydrolýza dimethylesteru Cer-1-P pomocí trimethylsilylbromidu, což je v literatuře nejpoužívanější činidlo pro tuto reakci, za vzniku výsledných Cer-1-fosfátů **20** a **23** ve výtěžku 55 % a 61 % (Obrázek 24).

**A**



**B**

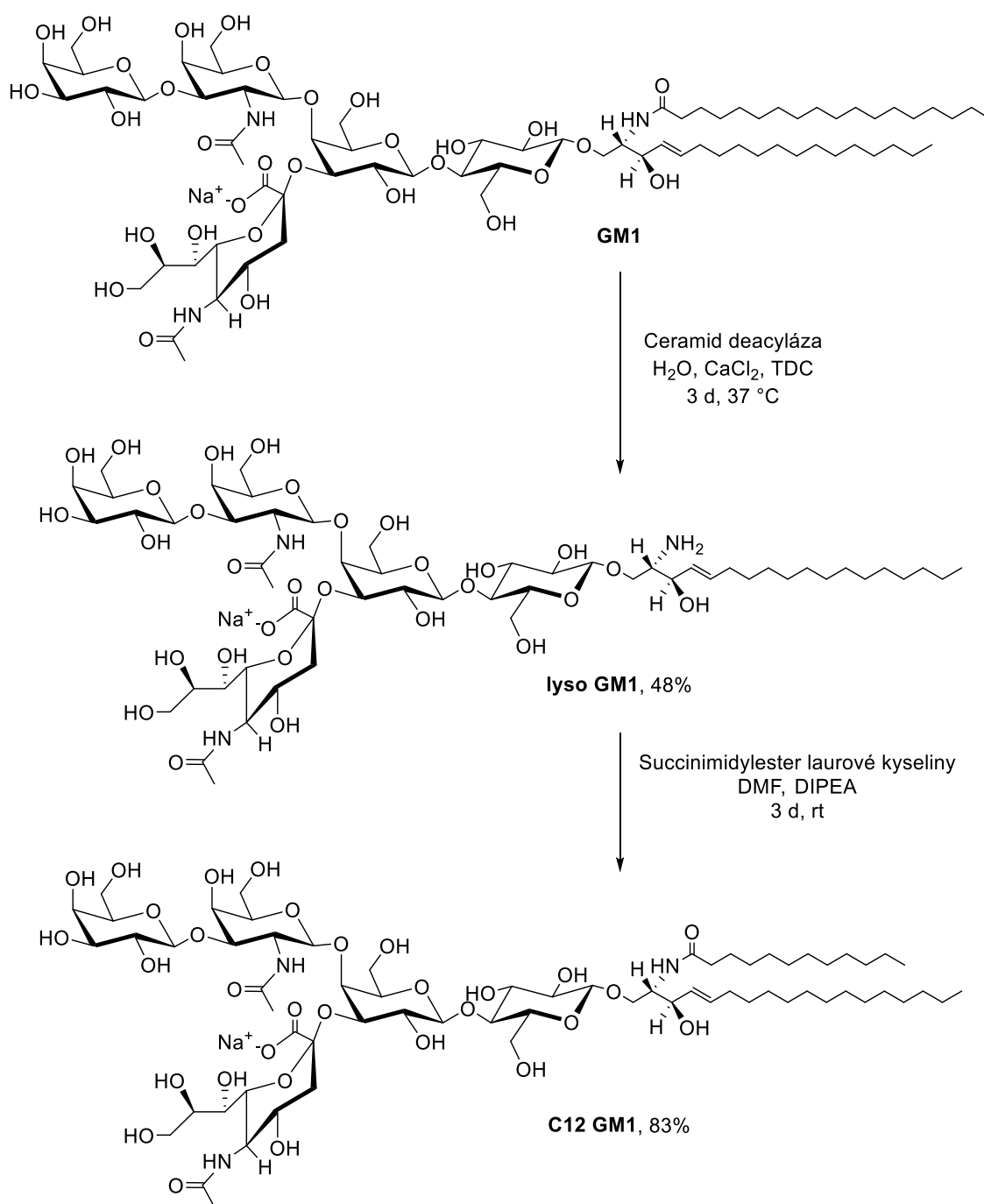


Obrázek 24. A: syntéza sfingosinového Cer-1-P. B: syntéza dihydrosfingosinového Cer-1-P

### 4.4. Syntéza modifikovaného gangliosidu GM1

Pro syntézu gangliosidu se zkráceným řetězcem jsme využili enzymatickou deacylaci přírodního gangliosidu a následnou acylaci vhodnou kyselinou. Enzym, který je zodpovědný za deacylaci gangliosidu, se nazývá Cer deacyláza a způsobuje odštěpení palmitové kyseliny z molekuly gangliosidu. Pro posunutí reakční rovnováhy více na stranu produktů, byly do

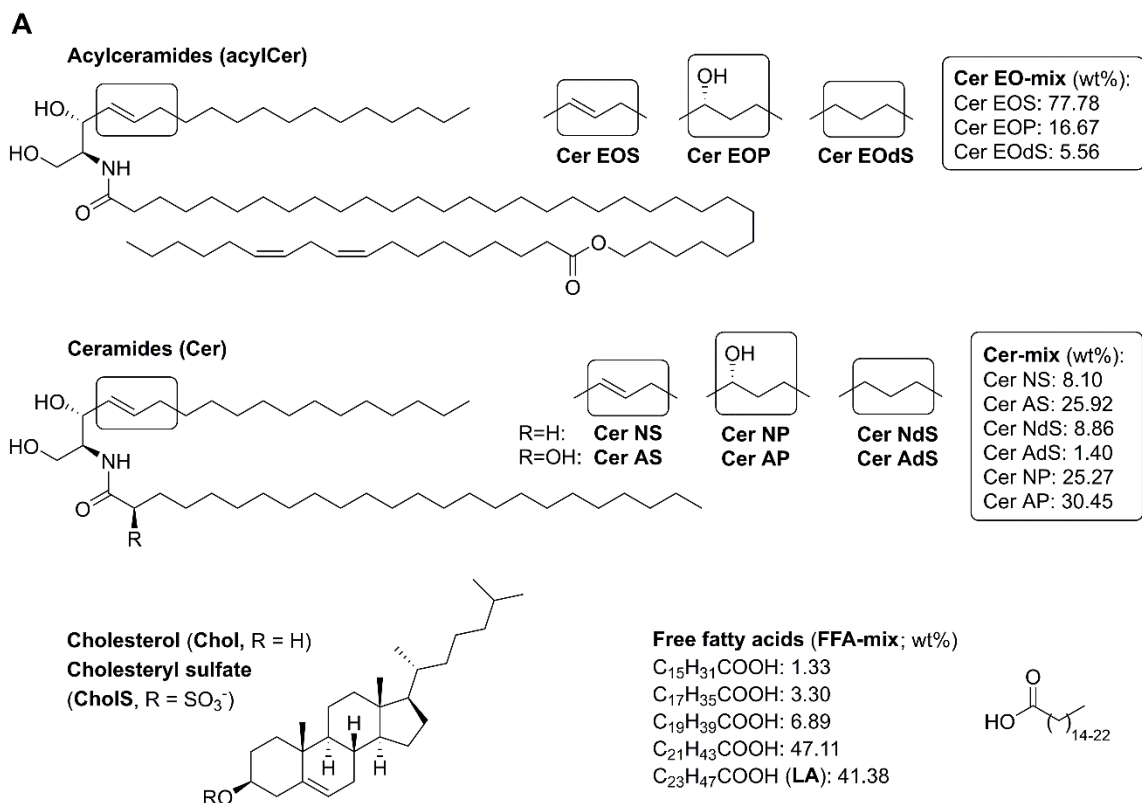
reakční směsi přidány vápenaté ionty, které stearovou kyselinu sráží v podobě její nerozpustné soli a pro zvýšení rozpustnosti GM1 byl do reakční směsi přidán taurodeoxycholát (TDC).<sup>136</sup> Po této reakci jsme získali deacylovaný gangliosid (**lyso GM1**) ve výtěžku přibližně 48 %. V dalším kroku tento **lyso GM1** reagoval se succinimidylesterem laurové kyseliny v přítomnosti DIPEA za vzniku zkráceného gangliosidu **C12 GM1** s výtěžkem 83 % (Obrázek 25).



#### **4.5. $\omega$ -O-acylCer v kožních lipidových membránách: vliv koncentrace, sfingoidní báze a složitosti modelu na mikrostrukturu a permeabilitu**

Pro studium vlivu koncentrace acylCer a struktury jejich sfingoidní báze na mikrostrukturu a permeabilitu byly vytvořeny dva modely lipidové membrány – jednoduchý a složitý model. Jednoduchý model se skládal z jednoho acylCer (Cer EOS), jednoho kratšího Cer (Cer NS), jedné mastné kyseliny (kyselina lignocerová) a cholesterolu s malým přídavkem cholesteryl-sulfátu. Tento model byl zaměřen hlavně na mikrostrukturu membrány, tj. určení koncentrace Cer EOS, která je nezbytná pro tvorbu LPP. Avšak tento model byl příliš jednoduchý na to, aby spolehlivě předpovídal permeabilitu membrán pro modelové látky. Proto byl sestaven složitý model, který se skládal z jednoho acylCer (Cer EOS, EOP, EOdS) nebo jejich směsi, směsi 6 kratších Cer, směsi 5 mastných kyselin (od 16C do 24C) a cholesterolu s malým přídavkem cholesteryl-sulfátu. Složení tohoto modelu bylo vybráno tak, aby se co nejvíce podobal složení lipidů v lidském SC. Struktury lipidů jsou znázorněny na Obrázku 26 A a složení jednotlivých modelů je popsáno na Obrázku 26 B.





**B**

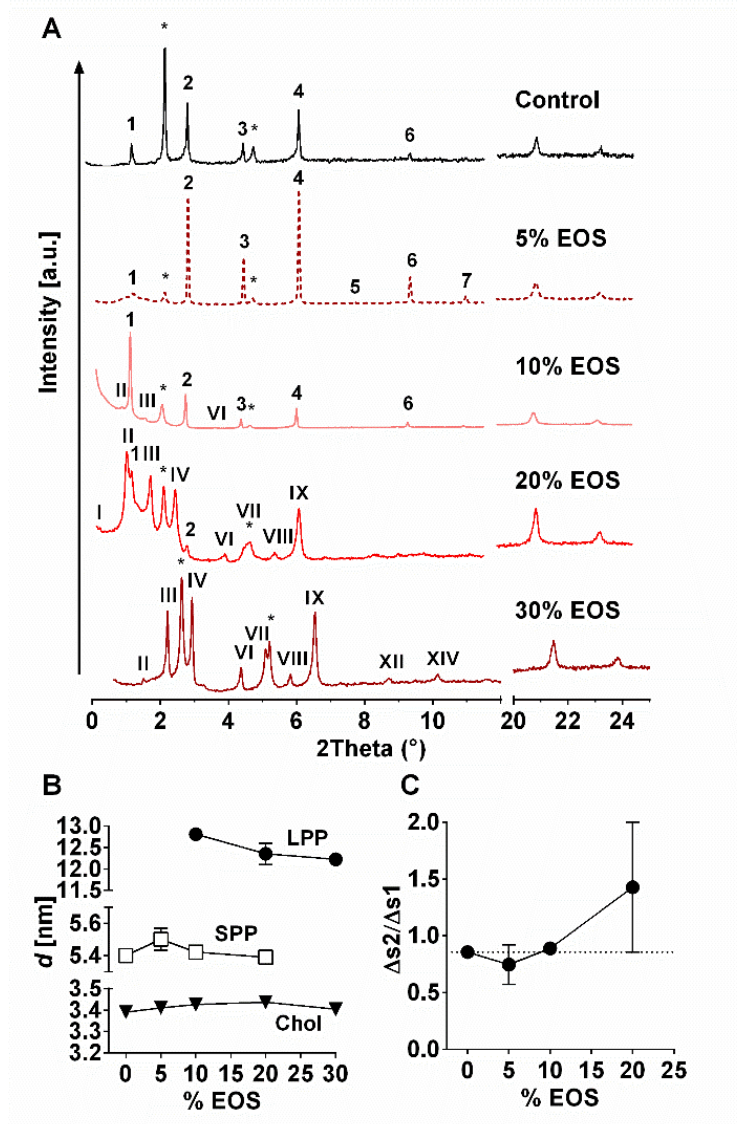
**Composition of the membrane models (Cer/FFA/Chol 1:1:1 molar ratio + 5 wt% CholS):**

Simple models: Cer(EOS+NS)/LA/Chol/CholS		Complex models: Cer (EO+Cer-mix)/FFA-mix/Chol/CholS	
Sample	Cer (molar ratio)	Sample	Cer (molar ratio)
Control	Cer NS	Control	Cer-mix
5% EOS	0.05 Cer EOS/0.95 Cer NS	10% EO-mix	0.1 Cer EO-mix/0.9 Cer-mix
10% EOS	0.1 Cer EOS/0.9 Cer NS	10% EOS	0.1 Cer EOS/0.9 Cer-mix
20% EOS	0.2 Cer EOS/0.8 Cer NS	10% EOP	0.1 Cer EOP/0.9 Cer-mix
30% EOS	0.3 Cer EOS/0.7 Cer NS	10% EOdS	0.1 Cer EOdS/0.9 Cer-mix

Obrázek 26. A: Struktury lipidů v modelových membránách a složení Cer EO-mix, Cer-mix a FFA-mix. B: Složení membrán jednoduchého a složitějšího modelu.

## 4.6. LPP se začíná objevovat při 10 % Cer EOS v jednoduchém modelu

Lipidové membrány jednoduchého modelu byly nejprve studovány pomocí práškové rentgenové difrakce (XRPD), abychom zjistili, jak koncentrace Cer EOS ovlivňuje mikrostrukturu těchto modelových membrán. Proto jsme srovnávali čtyři modely s rostoucí koncentrací Cer EOS (od 5 % do 30 %) s kontrolou bez Cer EOS (Obrázek 27).



Obrázek 27. Mikrostruktura lipidových membrán jednoduchého modelu, složeného z Cer EOS, Cer NS, LA, Chol a CholS s množstvím Cer EOS v Cer frakci od 0 % (kontrola) po 30 %. A: Prášková rentgenová difrakce membrán jednoduchého modelu. Arabská čísla náležejí fázi *La* (SPP), římská čísla náležejí fázi *Lb* (LPP) a hvězdička náležejí separovanému Chol. B: Mezirovinná vzdálenost lamelární fáze *La* (SPP), *Lb* (LPP) a Chol vztažená na koncentraci Cer EOS. C: Poměr šířky v půli maxima druhé a první reflexe lamelární fáze *La* (SPP) vztažená na koncentraci Cer EOS.

Kontrolní membrána (0 % Cer EOS) a membrána s 5 % Cer EOS obsahovala sérii reflexí s mezirovinnou vzdáleností  $d = 5,40 \pm 0,00$  nm a  $d = 5,50 \pm 0,06$  nm (Obrázek 27A). Tato fáze (*La*) má podobnou mezirovinnou vzdálenost jako SPP, která byla nalezena v lidském SC s mezirovinnou vzdáleností 5,3 – 6,4 nm.<sup>6-10, 89</sup> Difraktogramy navíc obsahovaly dvě reflexe separovaného Chol, což odpovídá předchozím zjištěním v prasečím a lidském SC.<sup>89, 137-138</sup> Separovaný Chol byl nalezen ve všech membránách jednoduchého modelu od 0 % do 30 %

Cer EOS s  $d = 3,39 \pm 0,00$  nm,  $d = 3,41 \pm 0,01$  nm,  $d = 3,43 \pm 0,01$  nm,  $d = 3,44 \pm 0,01$  nm a  $d = 3,40 \pm 0,01$  nm (Obrázek 27B). Zajímavé je, že intenzity reflexí Chol v porovnání s SPP výrazně poklesly po přidání 5 % Cer EOS.

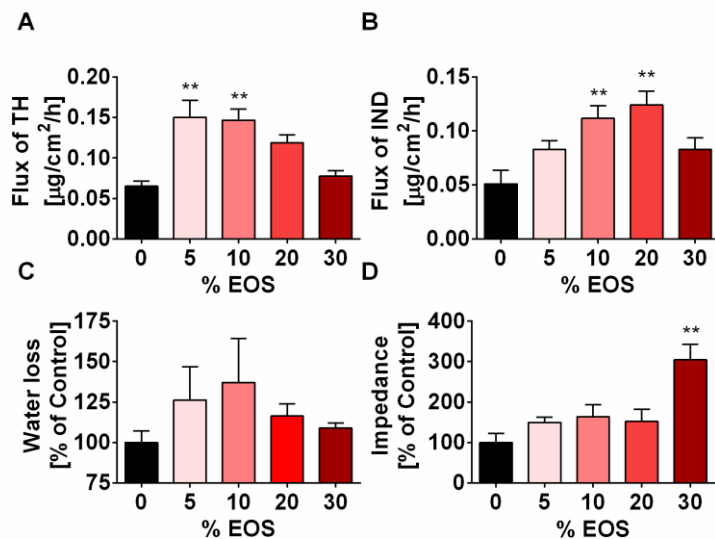
Membrána s 10 % Cer EOS obsahovala *La* fázi, podobnou SPP, s mezirovinnou vzdáleností  $d = 5,42 \pm 0,02$  nm. Navíc se při 10 % Cer EOS začala tvořit další lamelární fáze (*Lb*). Tato fáze *Lb* má vyšší mezirovinnou vzdálenost než *La*, která dosahuje  $d = 12,81 \pm 0,00$  nm, což odpovídá LPP.<sup>89</sup> Při zvýšení množství Cer EOS z 10 % na 20 % se intenzita *Lb* fáze ( $d = 12,35 \pm 0,25$  nm, 7 reflexí), v porovnání s *La* fází, zvyšuje. Při 20 % Cer EOS se objevují pouze dvě slabé reflexe fáze *La* s  $d = 5,39 \pm 0,03$  nm. Další zvýšení množství Cer EOS v membráně vede ke kompletnímu vymizení fáze *La* z difraktogramu a zůstává pouze fáze *Lb* s mezirovinnou vzdáleností  $d = 12,22 \pm 0,01$  nm a separovaný Chol (Obrázek 25B).

Rozsah lipidových fluktuací v membráně (Obrázek 27C) může být určen z poměru šířky v polovině výšky druhé ( $\Delta s_2$ ) a první ( $\Delta s_1$ ) reflexe.<sup>139</sup> V našich membránách bylo možné toto vypočítat pouze pro fázi *La*, protože první reflexe fáze *Lb* nebyla nalezena, případně byla velmi slabá. Poměr  $\Delta s_2/\Delta s_1$  fáze *La* v kontrolní membráně byla  $0,86 \pm 0,00$ . Při zvyšování koncentrace Cer EOS tento poměr poklesl na  $0,75 \pm 0,17$  pro 5 % Cer EOS a poté se zase zvýšil na  $0,89 \pm 0,06$  při 10 % Cer EOS a  $1,43 \pm 0,57$  při 20 % Cer EOS. Tudíž fluktuace fáze *La* se sníží při přidání 5 % Cer EOS, ale zase se zvýší ve chvíli, kdy se vytvoří LPP.

#### **4.7. Cer EOS neočekávaně zvyšuje permeabilitu jednoduchého modelu**

Poté jsme studovali, jak koncentrace Cer EOS a zároveň tvorba lamelárních fází v jednoduchém modelu ovlivňuje permeabilitu. Permeabilita membrány byla zkoumána pomocí čtyř ukazatelů: flux theofylinu (TH), flux indometacinu (IND), ztráta vody přes membránu a elektrická impedance.

Flux TH přes kontrolní membránu jednoduchého modelu bez Cer EOS byl  $0,07 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Obrázek 28A). Přítomnost 5 % a 10 % Cer EOS zvýšila flux TH více než dvakrát (signifikantní při  $p < 0,01$ ) na hodnoty  $0,15 \pm 0,02$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a  $0,15 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Další zvyšování v podílu Cer EOS na 20 % a 30 % vedlo ke snížení fluxu na  $0,12 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a  $0,08 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (není signifikantní oproti kontrole).



Obrázek 28. Ukazatele permeability jednoduché lipidové modelové membrány složené z Cer EOS, Cer NS, LA, Chol a CholS s množstvím Cer EOS v Cer frakci od 0 % (kontrola) do 30 %. A: Flux TH. B: Flux IND. C: Ztráta vody přes membránu relativní ke kontrole. D: Elektrická impedance relativní ke kontrole. Data jsou prezentována jako průměry  $\pm$  standardní chyba průměru. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly oproti kontrole při  $p < 0,01$  (\*\*) a  $p < 0,05$  (\*), ANOVA.

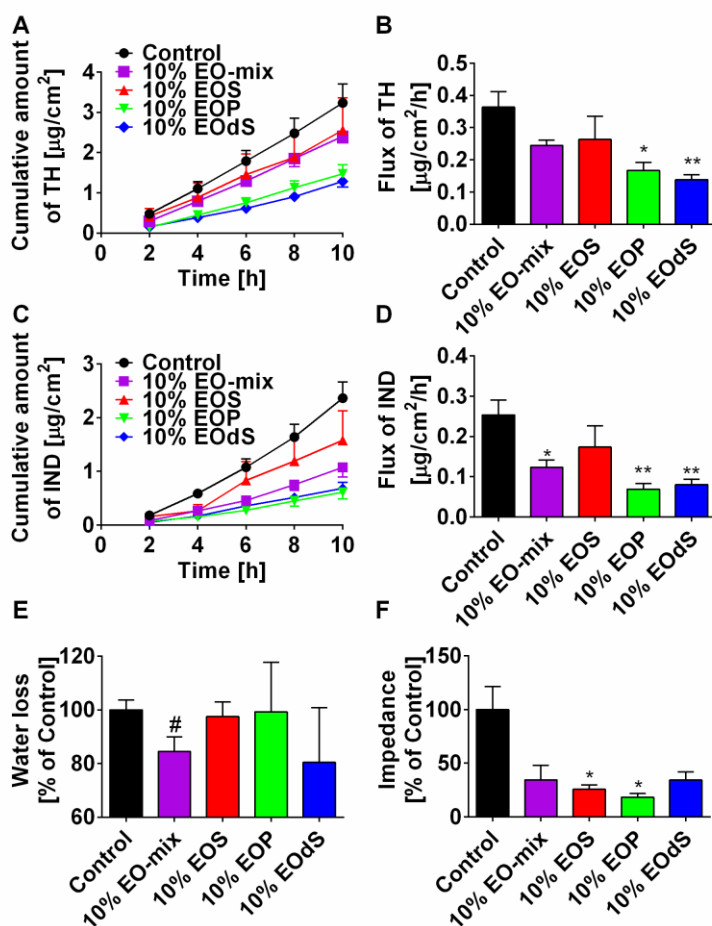
Podobný zvonovitý trend v permeabilitě byl nalezen pro flux IND přes membrány jednoduchého modelu (Obrázek 28B). Flux IND přes kontrolní membránu byl  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Přítomnost Cer EOS zvýšila flux IND přes membránu s maximem při 10 % a 20 % Cer EOS ( $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a  $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ;  $p < 0,01$  při srovnání s kontrolou). V membráně s 30 % Cer EOS flux poklesl na  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ , což je stále o 60 % více, než v kontrolní membráně, avšak ne signifikantně.

Třetím ukazatelem permeability byla ztráta vody přes membránu (Obrázek 28C), která byla měřena pomocí evaporimetru, který se normálně používá pro měření transepidermální ztráty vody (TEWL) *in vivo*, ale může být rovněž využit v *in vitro* experimentech.<sup>140</sup> Ztráta vody přes kontrolní membránu byla stanovena jako 100 % a ostatní hodnoty byly normalizovány podle kontroly. Přítomnost Cer EOS v membránách vedla ke zvýšení ztráty vody přes tyto membrány ve srovnání s kontrolou s maximem při 10 % Cer EOS (o 37 % vyšší než kontrola, ale ne signifikantně).

Poslední parametr permeability membrány byla elektrická impedance (Obrázek 28D), což je odolnost membrány proti průchodu střídavého proudu. Membrány s 5 %, 10 % a 20 % Cer EOS měly hodnoty impedance zvýšené o 50 %, 64 % a 52 % v porovnání s kontrolou (statisticky nevýznamně). Impedance membrány s 30 % Cer EOS byla třikrát vyšší než kontrola ( $p < 0,01$ ).

## 4.8. Komplexní model lépe napodobuje vliv acylCer na permeabilitu

Předchozí vliv Cer EOS a formování LPP na permeabilitu membrán byl velmi nečekaný. Předpokládali jsme, že důvodem tohoto chování byla přílišná jednoduchost modelu. Proto jsme připravili komplexnější model s 6 až 9 podtřídami Cer a 5 rozdílnými mastnými kyselinami (viz. Obrázek 24). AcylCer byly do tohoto modelu přidány v 10 % (z celkového množství Cer), což by mělo být dostatečné množství pro tvorbu LPP fáze a blíží se jejich fyziologické koncentraci.<sup>108, 141-143</sup> Permeabilita komplexního modelu byla zkoumána s využitím stejných ukazatelů permeability jako u jednoduchého modelu (Obrázek 29).



Obrázek 29. Ukazatele permeability komplexní lipidové modelové membrány složené z Cer EO-mix, Cer-mix, FFA-mix, Chol a CholS s podílem Cer EO-mix v Cer frakci na 10 %. A: Permeabilitní profily TH. B: Flux TH. C: Permeabilitní profily IND. D: Flux IND. E: Ztráta vody přes membránu relativní ke kontrole. F: Elektrická impedance relativní ke kontrole. Data jsou prezentována jako průměry  $\pm$  standardní chyba průměru. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly oproti kontrole při  $p < 0,01$  (\*\*) a  $p < 0,05$  (\*), ANOVA. # označuje statisticky významné rozdíly oproti kontrole při  $p < 0,05$ , t-test.

Nejprve byla studována permeabilita TH přes membrány komplexního modelu. Obrázek 29A ukazuje permeační profily (kumulativní množství TH, které prošlo 1 cm<sup>2</sup> membrány v čase) a Obrázek 29B ukazuje flux TH, vypočtený z permeačních profilů. Flux TH přes kontrolní membránu byl  $0,36 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Přidání 10 % acylCer snížilo flux TH ve srovnání s kontrolou: membrány s Cer EO-mix, Cer EOS, Cer EOP a Cer EODs měly flux TH postupně  $0,24 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (nesignifikantní),  $0,26 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (nesignifikantní),  $0,17 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  ( $p < 0,01$ ) a  $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  ( $p < 0,01$ ).

V případě IND, jako modelové látky (Obrázek 29C a D), byly vlivy 10 % acylCer obdobné jako u TH: kontrolní membrána bez acylCer měla nejvyšší flux ( $0,25 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), zatímco Cer EO-mix, Cer EOS, Cer EOP a Cer EODs měly snížený flux na  $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  ( $p < 0,05$ ),  $0,17 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (nesignifikantní),  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  ( $p < 0,01$ ) a  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  ( $p < 0,01$ ).

Podobné trendy byly pozorovány i u relativní ztráty vody přes membránu (Obrázek 29E). Nejnižší hodnoty (o 16 % a o 20 % menší ztráta vody oproti kontrole) byly nalezeny u membrán, obsahujících Cer EO-mix ( $p < 0,05$ , t-test) a Cer EODs.

Elektrická impedance (Obrázek 29F) však poskytla jiné výsledky: ve srovnání s kontrolou měly všechny membrány s acylCer sníženou impedanci (o 65 % až 82 %), což znamená nižší odolnost proti průchodu střídavého proudu. Efekty Cer EOS a Cer EOP byly statisticky významné při porovnání s kontrolou.

#### **4.9. Pouze Cer EO-mix, nikoliv jednotlivé acylCer tvoří LPP v komplexním modelu**

Abychom potvrdili, že snížená permeabilita komplexních modelových membrán k TH, IND a vodě, způsobená acylCer, je ve shodě s LPP, byly změřeny XRPD těchto membrán (Obrázek 30). Ve všech difraktogramech byla nalezena první a druhá reflexe separovaného Chol. Mezirovinná vzdálenost této Chol fáze byla  $d = 3,41 \pm 0,00 \text{ nm}$ ,  $d = 3,41 \pm 0,00 \text{ nm}$ ,  $d = 3,42 \pm 0,01 \text{ nm}$ ,  $d = 3,41 \pm 0,00 \text{ nm}$  a  $d = 3,42 \pm 0,00 \text{ nm}$  v kontrolní membráně a v membránách s Cer EO-mix, Cer EOS, Cer EOP a Cer EODs v tomto pořadí (Obrázek 30B). Tento výsledek je podobný výše zmíněným výsledkům z jednoduchého modelu a odpovídá krystalickému Chol monohydrátu.<sup>144</sup>

V kontrolní membráně byla nalezena pouze jedna série reflexí (kromě reflexí Chol), která odpovídá fázi *La*. Mezirovinná vzdálenost této fáze (*La*) byla  $d = 5,38 \pm 0,01 \text{ nm}$ , což odpovídá SPP ( $d = 5,3 - 6,4 \text{ nm}$ ).<sup>6-10, 89</sup> Difraktogramy membrán s jednotlivými acylCer Cer

EOS, Cer EOP a Cer EODs byly překvapivě podobné kontrole: byla nalezena pouze fáze SPP (*La*) s meziovinou vzdáleností  $d = 5,36 \pm 0,02$  nm,  $d = 5,37 \pm 0,00$  nm a  $d = 5,37 \pm 0,00$  nm a separovaný Chol. Při  $Q = 6,75$  nm<sup>-1</sup> byla nalezena neznámá reflexe.

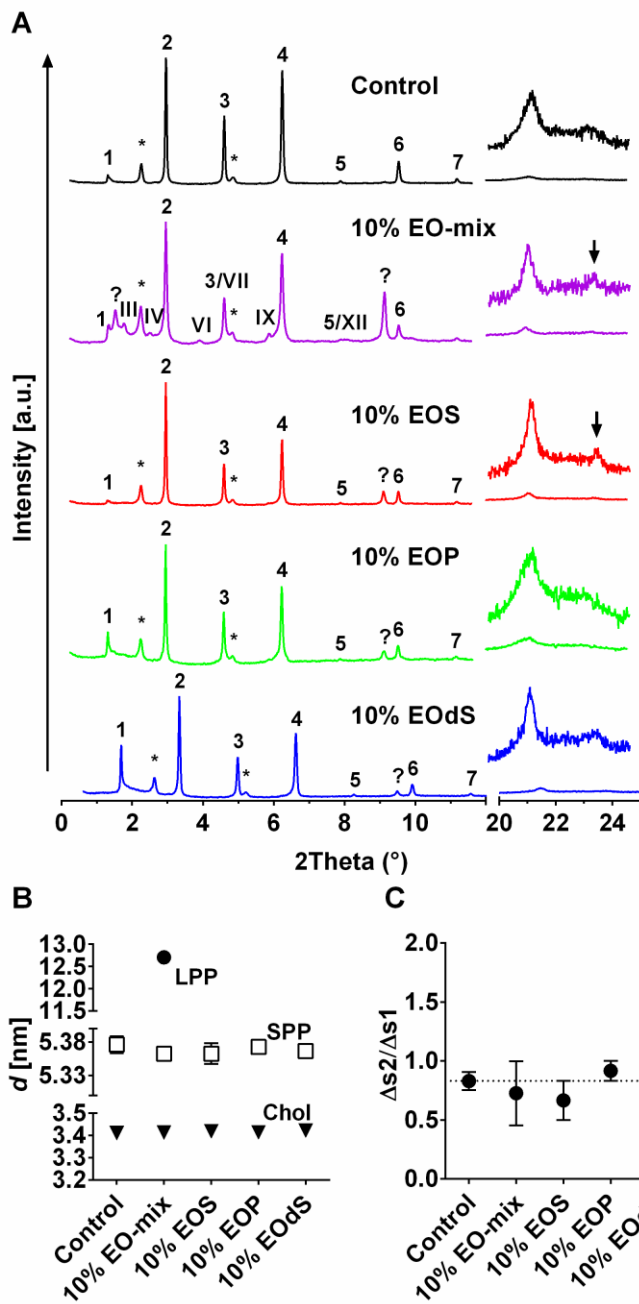
Jediná membrána komplexního modelu, která tvořila LPP, byla membrána obsahující 10 % Cer EO-mix. První série reflexí (*La*) s meziovinou vzdáleností  $d = 5,36 \pm 0,01$  nm byla přiřazena SPP. Druhá fáze (*Lb*) s meziovinou vzdáleností  $d = 12,71 \pm 0,00$  nm byla přiřazena LPP (Obrázek 30A a B). Navíc k těmto dvěma fázím a separovanému Chol byly nalezeny neidentifikované reflexe při  $Q = 1,36$  nm<sup>-1</sup> a  $6,75$  nm<sup>-1</sup>.

Fluktuační lipidy ve fázi *La* byly u komplexního modelu stanovovány stejně jako u předchozího (Obrázek 30C). Poměr  $\Delta s_1/\Delta s_2$  v kontrolní membráně byl  $0,83 \pm 0,08$ , což se podobá jednoduchému modelu. Tento poměr byl snížen v přítomnosti Cer EO-mix a Cer EOS ( $0,70 \pm 0,27$  a  $0,67 \pm 0,17$ ) a zvýšen u membrán s Cer EOP a Cer EODs ( $0,92 \pm 0,08$  a  $0,98 \pm 0,23$ ). Všechny membrány komplexního modelu měly poměr  $\Delta s_1/\Delta s_2$  nižší než 1, což odpovídá dobře organizovanému lamelárnímu systému.

#### 4.10. Laterální uspořádání lipidů

Oblasti širokých úhlů difraktogramů (v rozmezí  $Q$  od  $14$  nm<sup>-1</sup> do  $18$  nm<sup>-1</sup>) jsou zobrazeny na Obrázku 27A a 30A v pravé části. Tato oblast difraktogramu poskytuje informaci o molekulárním uspořádání na krátkou vzdálenost, v tomto případě o laterálním uspořádání lipidových uhlovodíkových řetězců. Ve všech jednoduchých modelech s nebo bez Cer EOS byly nalezeny dvě reflexe při  $Q = 15,13 - 15,24$  nm<sup>-1</sup> a při  $Q = 16,75 - 16,84$  nm<sup>-1</sup>. Odpovídající vzdálenosti mezi lipidovými řetězci  $0,41 - 0,42$  nm a  $0,37 - 0,38$  nm byly přiřazeny orthorhombickému uspořádání lipidových řetězců.<sup>145</sup>

V komplexním modelu došlo ke změně situace. Reflexe, které indikují orthorhombické uspořádání řetězců, byly jasně nalezeny pouze v membráně, obsahující 10 % Cer EOS a Cer EO-mix (označeno šipkami na Obrázku 30A). Relativní intenzita reflexe při  $Q = 16,79$  nm<sup>-1</sup> byla velmi slabá. Kontrolní membrána a membrány s obsahem 10 % Cer EOP a Cer EODs vykazují pouze jednu reflexi při  $Q = 15,13 - 15,24$  nm<sup>-1</sup>, která ukazuje na méně těsné, hexagonální, uspořádání řetězců.<sup>7, 146-147</sup> Tudíž pouze ty komplexní modely, které obsahují Cer EOS (ať už samotný nebo obsažený v Cer EO-mix), mohou tvořit orthorhombické laterální uspořádání při 10 % obsahu acylCer.



Obrázek 30. Mikrostruktura komplexní lipidové modelové membrány složené z Cer EO-mix, Cer-mix, FFA-mix, Chol a CholS s podílem Cer EO-mix v Cer frakci na 10 %. A: Prášková rentgenová difrakce komplexních membrán. Arabská čísla náleží fázi *La* (SPP), římská čísla náleží fázi *Lb* (LPP) a hvězdička náleží separovanému Chol. Šipky ukazují slabou reflexi, která naznačuje přítomnost orthorhombického uspořádání. B: Mezilamelární vzdálenosti fází *La* (SPP), *Lb* (LPP) a Chol jednotlivých acylCer a jejich směsi. C: Poměr šířky v půli maxima druhé a první reflexe lamelární fáze *La* (SPP) individuálních acylCer a jejich směsi.



## 5. Diskuse

### 5.1. Syntéza lidských acylCer s ultra-dlouhým řetězcem

Připravili jsme všechny hlavní podtřídy přírodních ultra-dlouhých Cer (**Cer EOS**, **Cer EOP**, **Cer EOdS** a **Cer EOH**). Celkový výtěžek této dvanáctikrokové syntézy byl 11 % v malém množství (v řádu do sta mg) a 7 % v gramovém měřítku (až po prekurzor **17**; finální acylCer byly připraveny v množství právě potřebném pro další experimenty). Hlavním konceptem námi vyvinuté syntézy je použití sukcinimidylesteru, který slouží jako chránící skupina, pomáhá překonat potíže s velmi nízkou rozpustností a zároveň aktivuje mastnou kyselinu pro její snadné připojení ke sfingoidní bázi ve vysokém výtěžku.

Prvním klíčovým krokem je syntéza omega hydroxylované, 30 – 32 uhlíků dlouhé kyseliny. Většina autorů pro tuto reakci využila Wittigovu reakci, která se i v našem případě ukázala jako jedna z nejspolehlivějších reakcí pro prodloužení řetězce na takovou délku (což je komplikováno velmi nízkou reaktivitou a rozpustností).<sup>24-25, 49</sup> Tashiro et al. v roce 2012 vyvinul syntézu, kdy je ultra-dlouhý řetězec vytvořen pomocí Grubbsovy metateze, avšak výtěžek této reakce také není příliš vysoký (45 %).<sup>26</sup>

Druhým klíčovým krokem je navázání kyseliny linolové na  $\omega$ -hydroxylovou skupinu. Tento krok může následovat hned po vytvoření kyseliny, což ušetří práci s chráněním hydroxylových skupin na sfingoidní bázi, případně může být tento krok proveden až po navázání na chráněnou sfingoidní bázi s následným odchráněním. První možnost zvolil Mori et al. s použitím chloridu kyseliny linolové<sup>24</sup> i Müller et al. s použitím 2-chloro-1-methylpyridinium iodidu<sup>25</sup> a nám se tento postup také osvědčil, avšak s využitím Yamaguchiho esterifikační reakce.<sup>49</sup> Druhou možnost zvolil Tashiro et al. rovněž s využitím chloridu kyseliny.<sup>26</sup>

Posledním klíčovým krokem je vazba připraveného acylu ke sfingoidní bázi a autoři opět zvolili rozdílný přístup. Mori et al. k tvorbě amidové vazby použil aktivaci kyseliny pomocí *p*-nitrofenylové skupiny,<sup>24</sup> Müller et al. použil aktivaci pomocí EEDQ (N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin),<sup>25</sup> Tashiro et al. použil aktivaci pomocí karbodiimidu<sup>26</sup> a nám se s vysokým výtěžkem podařilo tento krok provést pomocí reakce sukcinimidylesteru připravené kyseliny s požadovanou sfingoidní bází.<sup>49</sup>

Celkově shrnuto, v tuto chvíli jsou v literatuře popsány čtyři postupy přípravy acylCer. Syntéza od Moriho et al. měla 13 kroků a její celkový výtěžek byl přibližně 18 %.<sup>24</sup> Müller et al. popsal rovněž třináctikrokovou syntézu s celkovým výtěžkem 3 %.<sup>25</sup> AcylCer připravené

Tashirem et al. měly místo kyseliny linolové navázanou kyselinu stearovou a jejich devítikroková syntéza dosáhla celkového výtěžku 16 %.<sup>26</sup> V našem případě byla syntéza dvanáctikroková s celkovým výtěžkem 11 %, avšak tuto syntézu se podařilo optimalizovat tak, že bylo možné pracovat i s gramovým množstvím látek.<sup>49</sup>

## 5.2. Syntéza Cer-1-P

Syntéza Cer-1-P, založeném na sfingosinu, byla již v literatuře popsána<sup>148-150</sup> a v tuto chvíli je možné jej zakoupit i komerčně, avšak jeho cena je dosti vysoká. Po několika neúspěšných pokusech (přímá fosforylace založená na reakci s 2-chlor-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxafosfinin-4-onem,<sup>148</sup> reakce s P(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> za podmínek dříve popsaných v literatuře<sup>150</sup>) jsme nakonec využili pro naši syntézu modifikovaný postup, navržený Bielawskou *et al.*<sup>135</sup> Komplikace je v zavedení fosfátové skupiny do molekuly Cer, protože Cer má dvě OH skupiny (primární a sekundární) a výsledný produkt je požadován jako 1-izomer. Tento problém se dá obejít pomocí selektivního chránění sekundární hydroxylové skupiny,<sup>149</sup> případně využitím postupu, který je selektivnější k primární hydroxylové skupině.<sup>148, 150</sup> Závěrečný krok je naopak komplikován velmi nízkou rozpustností vznikajícího produktu a složitým čištěním.

Nakonec se nám podařilo připravit oba Cer-1-P pomocí tříkrokové syntézy založené na přípravě Cer s požadovanou délkou řetězce, který byl poté fosforylován pomocí P(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> za podmínek mezifázového přenosu a v posledním kroku byly odštěpeny methylové skupiny působením trimethylsilylbromidu. Celkový výtěžek syntézy byl 34 % pro Cer-1-P založený na sfingosinu a 45 % pro Cer-1-P založený na dihydrosfingosinu. Tyto molekuly budou dále využity při studiu jejich úlohy v buněčné signalizaci při tvorbě kožní bariéry<sup>151</sup> a při studiu jejich chování v lipidových membránách.

## 5.3. Syntéza modifikovaného gangliosidu GM1

Gangliosidy, vyskytující se v savčích tkáních, mají v acylovém řetězci vázáno 16 a více atomů uhlíku. Takové gangliosidy se získávají převážně izolací, ale nejsou vhodné jako lipidové standardy pro analýzu, jelikož interferují s biologickým materiálem. Proto bylo potřeba připravit co nejpodobnější gangliosid, který se však už ve tkáních nevyskytuje. Zvoleno proto bylo zkrácení acylu na 12 atomů C. Pro tuto obměnu jsou v literatuře dostupné dvě možnosti: čistě chemická<sup>152</sup> a s využitím enzymatické deacylace přírodního gangliosidu.<sup>136, 152</sup> Enzymatická reakce má výhodu v tom, že rozpojuje pouze jedinou (amidovou) vazbu v Cer části a nezasahuje do dalších amidových vazeb v cukerné části. Chemická cesta je

levnější, ale po chemickém odštěpení acylu v Cer části dochází i k odštěpení acetylových zbytků v cukerné části a tyto acetylové skupiny je potřeba v posledním kroku opět vytvořit. Pro posunutí reakční rovnováhy enzymatické deacylace více na stranu produktů se do reakční směsi (vodná fáze) přidává n-dekan, který se s vodou nemísí a ve kterém se rozpouští vznikající kyselina,<sup>152</sup> nebo vápenaté ionty, které stearovou kyselinu sráží v podobě její nerozpustné soli.<sup>136</sup> Vybrali jsme si druhou možnost, která je vzhledem k velmi malým množstvím reaktantů jednodušší na provedení.

Touto dvoukrokovou syntézou, která zahrnovala enzymatické odštěpení acylu gangliosidu GM1 a následnou acylaci vhodně dlouhou kyselinou, jsme získali gangliosid se zkráceným řetězcem. Celkový výtěžek reakcí byl 40 % a získali jsme přibližně 1,9 mg produktu, což je množství, které dostačuje jako standard pro hmotnostní analýzu biologického materiálu.

#### **5.4. $\omega$ -O-acylceramidy v kožních lipidových membránách: vlivy koncentrace, sfingoidní báze a složitosti modelu na mikrostrukturu a permeabilitu**

AcylCer (Cer třídy EO, například Cer EOS) jsou esenciální pro správné fungování kožní bariéry; poruchy v jejich biosyntéze byly nalezeny u několika závažných kožních onemocnění, jako je AD, psoriáza nebo LI.<sup>18-20, 153</sup> Naše porozumění chování acylCer v kožní bariéře je limitováno dvěma problémy: zaprvé je to komerční nedostupnost acylCer a zadruhé vysoce komplexní směs lipidů v kožní bariéře komplikuje detailní studium na molekulární úrovni.

Druhý problém se dá částečně překonat pečlivě vybranými modelovými lipidovými membránami. Ačkoliv všechny experimentální modely obsahují určitou úroveň zjednodušení, několik modelových lipidových membrán bylo popsáno jako užitečný nástroj studia vlivu struktury na permeabilitu membrán.<sup>137, 146, 154-155</sup>

##### **5.4.1. Membrány jednoduchého modelu velmi dobře reprodukuje mikrostrukturu lipidů SC, ale nikoliv však jejich permeabilitu**

Vytvořili jsme jednoduchou modelovou membránu SC, která se skládala z jednoho acylCer (Cer EOS), jednoho Cer (Cer NS), jedné mastné kyseliny (LA), Chol a CholS. Množství Cer EOS se pohybovalo v rozmezí 0 % až 30 % z celkového množství Cer. Nejprve jsme pomocí XRPD ověřili, že inkorporace Cer EOS do membrány umožňuje tvorbu LPP. Cílem tohoto experimentu rovněž bylo najít koncentraci acylCer (Cer EOS), při které dochází k formování

LPP v tomto modelu. V kontrolní membráně bez acylCer byla nalezena pouze SPP, což je v souladu s tím, že acylCer mají důležitou roli ve formování LPP ve SC.<sup>29</sup> Kromě toho kontrola i všechny ostatní membrány obsahovaly separovaný Chol s  $d =$  přibližně 3,40 nm, což odpovídá zjištěním v literatuře.<sup>44, 144</sup>

V membránách s 5 % Cer EOS, což je přibližně polovina jeho fyziologické koncentrace ve SC, byla nalezena pouze SPP fáze. V tomto případě je Cer EOS pravděpodobně inkorporován do SPP, což je podpořeno i zvýšenou mezirovinnou vzdáleností SPP (z 5,40 nm na 5,50 nm) a částečně zvýšeným uspořádáním této fáze ve srovnání s kontrolou. Další možné vysvětlení je, že Cer EOS tvořil struktury, které se periodicky neopakovaly v takto malém množství acylCer a tudíž nebyly detekovány pomocí XRPD. Tento výsledek je konzistentní s nedostatkem LPP v kožních onemocněních s nižším obsahem acylCer.<sup>119</sup> Avšak naše zjištění se neshoduje s výsledky de Jager *et al.*, která sestavila modely obsahující Cer EOS, Cer NP, Cer z hovězího mozku (v poměru 1:7:2), směs mastných kyselin a Chol a zjistila, že malé množství LPP se začíná tvořit již při 5 % Cer EOS.<sup>8</sup> Tato nesrovnalost může být způsobena použitím jiných Cer v našem modelu.

Při zvýšení koncentrace Cer EOS na 10 % a 20 % se v difraktogramu objevila LPP fáze společně s SPP a Chol. Formování LPP bylo doprovázeno poklesem v mezirovinné vzdálenosti SPP na 5,42 nm a 5,39 nm při 10 % a 20 % Cer EOS a zároveň se zvýšily fluktuace v této fázi, hlavně při 20 % Cer EOS. Relativní měření lipidových fluktuací v SPP fázi při 10 % Cer EOS vyšlo stále menší než 1, což ukazuje na dobré uspořádání membrány. Podobné hodnoty byly nalezeny pro kožní modelové lipidové membrány v práci Pullmannové *et al.*, která nahrazovala Cer za jejich prekurzor sfingomyelin, aby napodobila špatnou metabolizaci sfingomyelinu. Membrány, které obsahovaly do 50 % sfingomyelinu, měly tyto hodnoty nižší než 1, další zvyšování množství sfingomyelinu vedlo ke snížení uspořádání lipidů<sup>154</sup> a hodnoty přesahovaly 2, což je typické pro fosfolipidové membrány.<sup>139</sup>

Koexistence SPP a LPP při 10 % a 20 % Cer EOS odpovídá fyziologickému uspořádání kožních lipidů<sup>154, 156</sup> a publikovaným modelovým membránám. V roce 2005 de Jager *et al.* studovali komplexnější model se směsí Cer (Cer EOS, NS, NP, AS, NP16 a AP), který obsahoval 15 % Cer EOS a našli LPP společně s SPP. Vynechání Cer AS a Cer AP z této směsi nebo nižší koncentrace Cer NS nezměnily chování tohoto modelu.<sup>27</sup> Několik dalších modelových lipidových kožních membrán s 15 % acylCer popisuje přítomnost jak SPP, tak i LPP.<sup>6, 146-147</sup>

Relativní intenzity reflexí LPP ve srovnání s SPP se zvyšovaly se zvyšující se koncentrací Cer EOS. Při 30 % Cer EOS se SPP fáze kompletně vytrácí a nalezena byla pouze LPP fáze. Mezirovinná vzdálenost LPP fáze byla nejvyšší při 10 % Cer EOS ( $d = 12,81$  nm) a postupně se snižovala až k  $d = 12,22$  nm při 30 % Cer EOS. Tyto hodnoty jsou rovněž ve shodě

s literaturou.<sup>27</sup> Toto rozmezí mezivzrostové vzdálenosti je biologicky relevantní, například v modelu rekonstruované kůže, na které byly aplikovány cytokiny, byly nalezeny periodicity LPP od 12,1 nm do 12,7 nm.<sup>157</sup>

Přítomnost LPP bez SPP fáze je také ve shodě s publikovanými studiemi, ve kterých byly použity acylCer v koncentraci 30 – 40 %, což umožnilo popisovat LPP bez interferencí z SPP fáze.<sup>7, 11, 158</sup> Modely s ještě větším množstvím acylCer byly také připraveny; Schröter *et al.* použili přibližně 70 % Cer EOS společně s Cer AP pro studii neutronové difrakce a navrhli odlišný model lipidové matrix SC pouze s SPP a s Cer EOS inkorporovaným do této krátké fáze.<sup>159</sup>

Orthorhombické laterální uspořádání bylo nalezeno ve všech membránách jednoduchého modelu se stabilními lamelárními vzdálenostmi mezi lipidovými řetězci 0,41 nm a 0,37 nm. Toto orthorhombické uspořádání bylo nalezeno v lidské kůži *in vivo* a je považováno za indikátor dobré bariérové funkce kůže.<sup>85-86, 147</sup>

Dále jsme zkoumali, jak koncentrace Cer EOS ovlivňuje permeabilitu membrán jednoduchého lipidového modelu s využitím čtyř ukazatelů permeability (flux TH, flux IND, ztráta vody přes membránu a elektrická impedance). TH a IND jsou modelové permeanty s rozdílnými fyzikálními vlastnostmi. TH je relativně malá ( $M_r = 108,16$ ), hydrofilní ( $\log P = 0$ ) molekula, u které se předpokládá, že bude difundovat přes fluktuace v lipidových řetězcích ve SC. TH byl dříve použit jako nástroj pro monitorování defektů kožní bariéry v místech s lézemi i bez lézí u atopické kůže v porovnání se zdravou kůží *in vitro*. Tyto výsledky korelovaly s *in vivo* permeacemi a prokázaly, že TH je vhodný nástroj studia bariérové funkce kůže.<sup>98</sup> Na druhou stranu IND je větší ( $M_r = 357,79$ ), lipofilnější ( $\log P = 4,3$ ) molekula, která spíše difunduje přes lipidové lamely ve SC.<sup>160</sup>

U kožních onemocnění bylo snížení hladiny acylCer doprovázeno zvýšením permeability kůže. Tento efekt byl také reprodukován *in vitro*: lipidové membrány, které neobsahovaly acylCer, vykazovaly téměř dvakrát vyšší permeabilitu k modelovým látkám (*p*-aminobenzoová kyselina a její deriváty) než membrány obsahující 15 % acylCer.<sup>155</sup> Proto jsme očekávali podobné výsledky. Hlavně nás zajímal vztah permeability k přítomnosti LPP a SPP fází, případně jejich směsi, v membránách.

Výsledky byly spíše překvapivé: membrány s obsahem 5 % - 20 % Cer EOS vykazovaly zvýšenou permeabilitu pro TH, IND a vodu v porovnání s kontrolní membránou bez Cer EOS. Zajímavé bylo, že inkorporace pouze 5 % Cer EOS, což odpovídá asi 1,67 % změně v celkovém složení lipidů a nestačí k tvorbě LPP, zvýšila permeabilitu membrány. Toto naznačuje lipidovou separaci, která nebyla viditelná na XRPD. Při 30 % Cer EOS v membráně,

kde se vyskytuje pouze LPP a Chol fáze, byla permeabilita snížena na podobnou úroveň (TH a voda) nebo lehce zvýšenou (IND) v porovnání s kontrolou. Změny v relativní ztrátě vody přes membránu byly relativně malé v porovnání s TH a IND, což odpovídá předchozím experimentům.<sup>154, 161</sup>

Elektrická impedance byla mírně zvýšena oproti kontrole u membrán, obsahujících mezi 5 % a 20 % Cer EOS. Překvapivě, membrána s 30 % Cer EOS, ve které se vyskytovala pouze LPP (a Chol) měla třikrát zvýšené hodnoty impedance v porovnání s kontrolou, tudíž měla třikrát vyšší odpor ke střídavému proudu, což indikuje nižší pohyb iontů přes membránu.<sup>162</sup>

Membrány, které obsahovaly pouze jedinou lamelární fázi (kromě separovaného Chol) – LPP nebo SPP, vykazovaly nejlepší bariérové vlastnosti pro TH, IND a vodu, zatímco koexistence LPP a SPP měla negativní efekt na membrány jednoduchého modelu. Tyto výsledky jsou v ostrém protikladu s pozorováními *in vivo* a s dobře známou důležitostí LPP fáze. Toto chování může být způsobeno nedostatkem heterogenity v jednoduchém modelu. Navíc LA je velmi dobře mísitelná s Cer NS s 24C acylovým řetězcem a tento Cer může být přítomen v otevřené konformaci, což může být zodpovědné za takto nízkou permeabilitu kontrolní membrány, složené z Cer NS/LA/Chol/CholS.<sup>163</sup> Přídavek Cer EOS do tohoto dobře smíšeného systému pravděpodobně mění mísitelnost lipidů a zvyšuje permeabilitu.

Náš jednoduchý model se zdá být příliš jednoduchý pro zachycení změn v permeabilitě, závislých na acylCer. Přesto, že selhání takto jednoduchého modelu nebylo úplně nečekané, velmi znepokojivé je, že tento model napodoboval jak lamelární uspořádání SC, tak orthorhombické uspořádání velmi dobře. Tudíž vztahy mezi lipidovým složením SC, jeho mikrostrukturou a permeabilitou nejsou přímočaré: podle všeho ani LPP ani orthorhombické uspořádání nejsou dostačující pro správné fungování lipidové bariéry.

#### **5.4.2. Permeabilita komplexních lipidových membrán: nejlepší bariérové funkce dosáhly Cer EOP a EODs**

Protichůdné výsledky permeability jednoduchého modelu nás vedly k přípravě složitějšího modelu s použitím 6 – 9 podtříd Cer a 5 mastných kyselin podle nejnovějších analýz kožních Cer<sup>108, 141-143</sup> a mastných kyselin.<sup>164</sup> Tento model napodoboval složení lidského SC blíže než jednoduchý model. Na základě fyziologických hladin acylCer a na základě mikrostruktury jednoduchého modelu byla koncentrace acylCer nastavena na 10 %, aby byly přítomny jak LPP tak i SPP. Cílem zkoumání složitějšího lipidového modelu bylo porovnání vlivu různých acylCer nebo jejich směsi na permeabilitu těchto membrán při 10 % koncentraci acylCer. Jediné Cer, které nebyly pro tvorbu modelu využity, byly Cer odvozené od 6-

hydroxysfingosinu, který není komerčně dostupný a jeho syntéza ve větších množstvích je stále výzvou.<sup>165</sup>

Zvýšení komplexity modelových membrán dramaticky ovlivnilo jejich permeabilitu. Zejména permeability kontrolní membrány byly zvýšeny v porovnání s jednoduchým modelem. Toto naznačuje, že náš jednoduchý model měl vskutku velmi nepropustnou lipidovou organizaci, která však byla velmi náchylná k jakémukoliv zásahu, způsobenému i malou změnou složení lipidů. Permeability našeho složitějšího modelu jsou v dobré shodě s modelovými membránami, zkonstruovanými z izolovaných lidských kožních Cer (hodnoty fluxu TH a IND byly  $0,40 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a  $0,23 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ).<sup>154</sup>

Při porovnání s kontrolní membránou bez acylCer se flux TH a IND přes všechny membrány s acylCer snížil. Stejně tak byly pozorovány mírně snížené hodnoty ztráty vody přes membránu. Na druhou stranu elektrická impedance byla významně snížena, což indikuje slabší odpor proti pohybu iontů přes komplexní membrány s 10 % obsahem acylCer ve srovnání s kontrolou.<sup>162</sup> Důvody těchto účinků acylCer na impedanci jsou neznámé, můžeme jen spekulovat, že je to způsobeno tvorbou domén.

Pozorované zesílení bariéry ve směru zvenčí dovnitř (flux TH a IND) a zevnitř ven (ztráta vody), způsobené acylCer při porovnání s kontrolní membránou velmi dobře koreluje s pozorováními *in vivo* u kožních onemocnění. V roce 1991 Imokawa *et al.* objevili pokles celkových hladin lipidů SC jak v místech s lézemi, tak i v místech bez lézí na kůži atopických pacientů. Největší pokles byl pozorován u Cer EOS.<sup>104</sup> Další zkoumání atopické kůže ukázalo, že kromě Cer EOS je také Cer NP signifikantně snížen a toto snížení bylo doprovázeno signifikantně zvýšenou transepidermální ztrátou vody (TEWL).<sup>18, 106, 108</sup> V roce 1993 Motta *et al.* našli signifikantní pokles množství Cer EOS, NP a AS (o 38 %, 66 % a 27 %) a zvýšené množství Cer NS a AS (o 66 % a 34 %) u psoriázy.<sup>19</sup> Navíc TEWL kůže s šupinatými psoriatickými plakami byl 2 – 3 krát zvýšen oproti zdravé kůži a 6 krát zvýšen po odstranění těchto plaků. Avšak žádné signifikantní změny nebyly nalezeny u nezasažené kůže pacientů s psoriázou.<sup>140</sup> V roce 1994 Paige *et al.* kvantifikovali Cer SC u vrozené ichtyózy a objevili statisticky snížené množství Cer EOS u lamelární ichtyózy.<sup>20</sup> Lavrijsen *et al.* zjistili, že pacienti s lamelární ichtyózou měli signifikantně (2 – 3 krát) zvýšený TEWL oproti zdravým pacientům.<sup>118</sup>

Zajímavé je, že nejslabší účinek ze všech studovaných acylCer vykazoval Cer EOS (založený na sfingosinu a nejběžnější z acylCer ve SC): Hodnoty fluxu TH a IND poklesly o přibližně jednu třetinu v porovnání s kontrolou a nebyl pozorován téměř žádný účinek na ztrátu vody přes membránu. Abychom prozkoumali vztah mezi strukturou a vlivem acylCer na permeabilitu membrány, nahradili jsme Cer EOS za Cer EOP a Cer EODs. Oba tyto Cer

postrádají *trans*-dvojnou vazbu v poloze 4 na sfingoidní bázi, Cer EOP má navíc v poloze 4 navázanou hydroxylovou skupinu. Jak na fytosfingosinu založený Cer EOP, tak i na dihydrosfingosinu založený Cer EODs vedly k výraznějšímu zlepšení bariérových schopností: permeability pro TH a IND byly sníženy o více než 60 % u obou těchto acylCer v porovnání s kontrolou. Na druhou stranu jejich účinek na relativní ztrátu vody přes membránu a elektrickou impedanci byl podobný Cer EOS. Důvod rozdílů v permeabilitě mezi membránami s rozdílnými podtřídami acylCer se zdají být spojeny s chybějící C4 *trans*-dvojnou vazbou v Cer EOP a Cer EODs. Dvojná vazba v Cer založených na sfingosinu obecně snižuje teplotu fázového přechodu, což indikuje nižší kohezivní síly v lipidové membráně.<sup>166</sup> Co se týče acylCer, vztahy mezi jejich strukturou a aktivitou nejsou příliš prozkoumané. V roce 2010 Kessner *et al.* srovnávali čistý Cer EOS s Cer EOP a zjistili, že Cer EOP byl schopen tvořit LPP i v suchém stavu, naopak Cer EOS potřeboval k tvorbě LPP hydrataci.<sup>12</sup> Oproti tomu de Jager *et al.* zjistili, že Cer EOS podněcuje tvorbu LPP účinněji než Cer EOP. Avšak pro jejich experimenty použili vyšší množství acylCer (15 %) ve srovnání s našimi modelovými membránami.<sup>27</sup>

Nakonec byly jednotlivé acylCer nahrazeny v komplexní membráně jejich směsí (Cer EO-mix), která obsahovala 7 % Cer EOS, 1,5 % Cer EOP a 0,5 % Cer EODs (z celkového podílu Cer), aby přibližně napodobovala složení Cer v lidské kůži. Účinek Cer EO-mix na permeabilitu se zdá být v souladu se složením této směsi a s efekty jednotlivých acylCer (to znamená, že permeability Cer EO-mix membrán jsou nižší než membrán s Cer EOS, ale vyšší než permeability s Cer EOP nebo EODs). Obecně permeability membrán s Cer EO-mix jsou blíže permeabilitám membrány s pouze Cer EOS, pravděpodobně proto, že Cer EOS je dominantním Cer v této směsi.

#### **5.4.3. Pouze směs tří acylCer tvoří LPP v membránách komplexního modelu**

Abychom pochopili rozdíly v permeabilitě membrán v přítomnosti různých acylCer v 10 % množství, studovali jsme mikrostrukturu membrán komplexního modelu s využitím XRPD. Očekávali jsme podobné výsledky jako u jednoduchého modelu s obsahem 10 % Cer EOS, tudíž koexistenci SPP, LPP a Chol. Avšak membrány s jednotlivými acylCer: Cer EOS, Cer EOP a Cer EODs netvořily LPP. Mikrostruktura těchto modelových membrán byla podobná u všech jednotlivých acylCer. Jediná lamelární fáze v těchto membránách byla fáze SPP s mezirovinnou vzdáleností 5,36 nm až 5,37 nm, což je téměř stejná mezirovinná vzdálenost jako u kontrolní membrány (5,38 nm). Separovaný Chol se nacházel ve všech membránách, jak s, tak i bez acylCer. Přestože byl pozorován pokles v permeabilitě ve všech těchto membránách s acylCer, očividně to nesouvisí s tvorbou LPP.



Jediná membrána komplexního modelu, ve které byla nalezena LPP fáze, byla membrána s Cer EO-mix. Mezirovinná vzdálenost LPP byla 12,71 nm, což je podobné membráně jednoduchého modelu s 10 % Cer EOS. Navíc byla nalezena SPP s mezirovinnou vzdáleností 5,36 nm a separovaný Chol. Tudíž heterogenita polární hlavy acylCer je velmi důležitá pro formování lamelární fáze LPP v komplexním modelu.

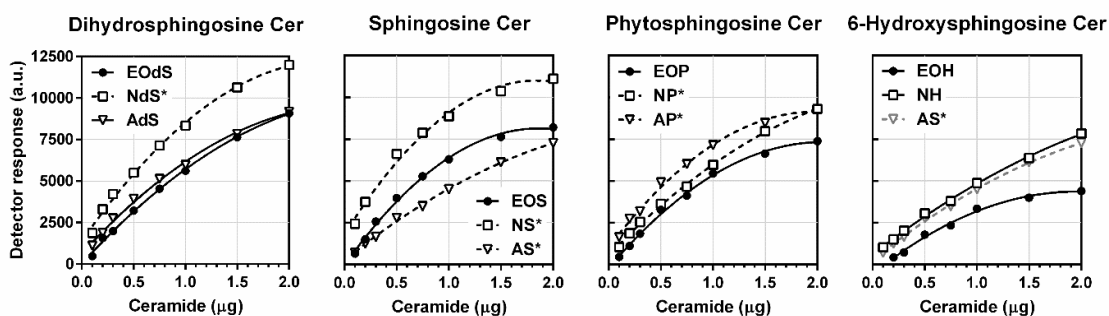
Co se týká laterální organizace lipidů v komplexním modelu, orthorhombické uspořádání bylo jasně nalezeno pouze u difraktogramů membrán, obsahujících Cer EO-mix a Cer EOS. V komplexních modelech bez acylCer nebo s Cer EOP a Cer EODS převládá hexagonální uspořádání. Větší volnost pohybu v hexagonálním uspořádání oproti orthorhombickému může vysvětlovat vyšší permeabilitu kontroly komplexního modelu než kontroly jednoduchého modelu. To také znamená, že Cer EOS (sám nebo ve směsi) napomáhá tvorbě orthorhombického uspořádání více než ostatní acylCer. Toto je ve shodě s daty, publikovanými de Jager *et al.*, kteří používali modelové membrány s obsahem Cer EOS a EOP v různých poměrech při koncentraci 15 % z celkového množství Cer.<sup>27</sup>

Překvapivě zde není žádná přímá korelace mezi lamelární a laterální organizací v membránách komplexního modelu a permeabilitními experimenty. Nejméně propustné membrány s Cer EODS netvořily ani LPP ani orthorhombické uspořádání. Přestože existuje jedna práce o tom, že orthorhombické uspořádání není nezbytné pro správné fungování modelů SC<sup>147</sup> a další studie ukázaly, že toto uspořádání může být pozorováno pouze v některých lipidových doménách,<sup>137</sup> tento nesoulad mezi orthorhombickým uspořádáním a permeabilitou odporuje předchozím zjištěním.<sup>86</sup> Nicméně toto je první zmínka ukazující, že přítomnost nebo absence LPP nemusí být spolehlivým indikátorem dobré nebo horší bariérové funkce – alespoň ne v *in vitro* modelových membránách. Tento viditelný rozpor našich výsledků s *in vivo* zjištěními, diskutovanými výše, může být spojen s nepřítomností korneocytální lipidové obálky v našich modelech (a ve všech dosud publikovaných modelech kožních lipidových membrán). Tato monovrstva kovalentně vázaných lipidů na povrchu korneocyty pravděpodobně hraje důležitou roli v organizaci a permeabilitě kožní lipidové bariéry.

## 5.5. HPTLC analýza ultra-dlouhých ceramidů v kůži

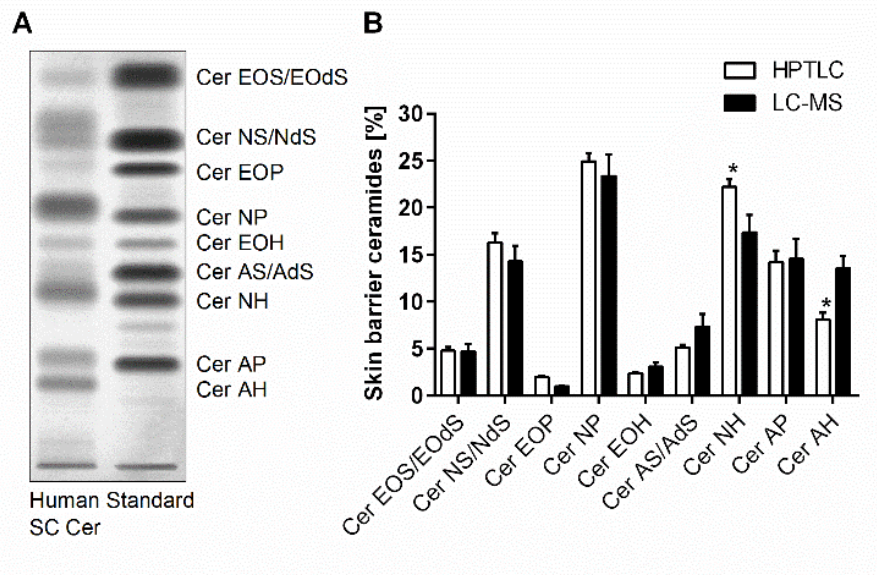
Připravené acylCer byly následně použity jako autentické standardy pro zlepšení kvantitativní analýzy Cer. Analýza kožních lipidů ve zdravé či nemocné kůži je základní metoda potřebná pro pochopení (pato)fyzilogických principů, týkajících se udržení/porušení homeostázy kůže.<sup>17, 60, 62, 167-168</sup> Většina analytických metod, primárně

HPTLC analýza<sup>17, 62, 167</sup> a nověji používaná LC-MS technika<sup>108, 141-143</sup>, je závislá na několika málo komerčně dostupných Cer podtřídách. Podařilo se nám dokázat, že využití jiných Cer podtříd pro kvantitativní analýzu, což je běžná praxe, vede k odchylkám ve výši až několik set procent. V rozsahu kalibrace (0,1 – 2 µg) jsou odchylky v kvantifikaci až 230 % (průměr 126 %) pro Cer EOS podle odpovědi detektoru na Cer NS; až 250 % (průměr 64 %) pro Cer EOP, počítáno podle Cer NP a až 306 % (průměr 145 %) pro Cer EOdS, kvantifikováno podle Cer NdS. Nejhorší výsledky byly získány pro Cer EOH, pro jehož kvantifikaci se nehodí žádný jiný Cer, protože potom dochází k výraznému nadhodnocení hladiny tohoto Cer. Proto je použití příslušných Cer standardů nezbytné pro přesnou kvantifikaci (Obrázek 31).



Obrázek 31. HPTLC analýza Cer: kalibrační křivky pro Cer podtříd

Připravené acylCer byly použity také jako standardy k porovnání s Cer, izolovanými z lidské kůže (Obrázek 32A). Bylo potvrzeno, že připravené acylCer se skutečně nachází i v lidské kůži. Použitím HPTLC se nám podařilo rozdělit devět podtříd lidských Cer. Cer odvozené od dihydrosphingosinu nebylo možné v dané soustavě oddělit od Cer založených na sphingosinu a byly kvantifikovány dohromady. Cer AH byl kvantifikován na základně Cer NH. Obrázek 32B ukazuje porovnání námi izolovaných a vycištěných Cer z lidské kůže s nedávno publikovanými výsledky, založenými na LC-MS analýze,<sup>108, 141-143</sup> což velmi dobře souhlasí i přesto, že byly analyzovány rozdílné kožní vzorky. Jediné statisticky významné rozdíly byly nalezeny v Cer NH a AH.



Obrázek 32. Analýza Cer podtříd v lidské kožní bariéře. A: HPTLC deska izolovaných lidských Cer (vlevo) a odpovídajících Cer standardů (vpravo). B: Kvantifikace Cer podtříd založená na HPTLC analýze s použitím připravených standardů v porovnání s publikovanými daty z LC-MS.

## 5.6. Stimulace PPAR $\alpha$ receptorů normalizuje složení kožních lipidů a zlepšuje kožní bariéru normální a filaggrin deficitní rekonstruované kůže

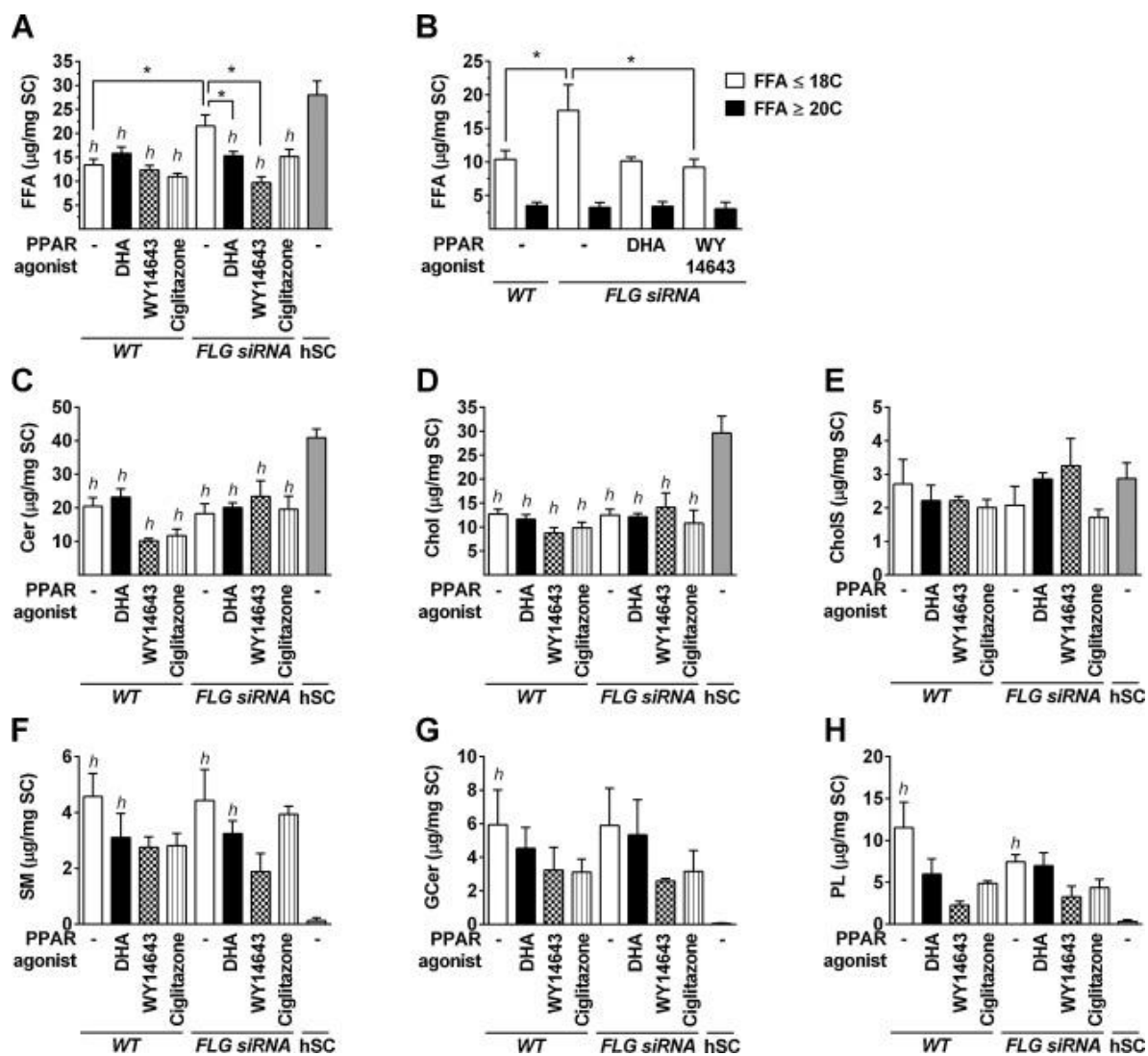
Mutace filaggrinu jsou známým rizikovým faktorem při rozvoji AD a zásadní příčinou ichthyosis vulgaris.<sup>100</sup> Bohužel přesný mechanismus vedoucí ke klinické manifestaci těchto kožních onemocnění není příliš dobře pochopen a možnosti terapie, která přesně cílí na příčinu, stále chybí.<sup>169</sup> V poslední dekádě se PPAR agonisté stali zajímavými kandidáty na léčbu zánětlivých kožních onemocnění, spojených s filaggrinem, díky protizánětlivému působení v modelech dráždivé a alergické kontaktní dermatitidy,<sup>35</sup> zvýšeného okyselení kůže<sup>170</sup> a stimulované syntézy kožních lipidů.<sup>34, 171-172</sup> Navíc souběžná aplikace glukokortikoidů a PPAR agonistů vyrovnává vedlejší účinky glukokortikoidů, jako je snížená exprese filaggrinu a ztenčování epidermis.<sup>36, 173</sup>

V lidské kůži jsou exprimovány izotypy PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  a PPAR $\gamma$ . PPAR $\beta/\delta$  se vyskytuje ve všech vrstvách epidermis, zatímco PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$  se hlavně vyskytují v suprabazálních kompartmentech.<sup>33-34</sup> PPAR jsou nezbytné pro homeostázu kůže, diferenciaci keratinocytů a obnovu kůže.<sup>174-175</sup> Proto se PPAR zdají být slibnými cíli při léčbě hyperproliferativních

nebo zánětlivých kožních poruch, kde konkrétně aktivace PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$  hraje hlavní roli. PPAR $\gamma$  reguluje buněčnou diferenciaci a působí jako regulátor inhibice imunitních buněk.<sup>37-38, 175</sup> PPAR $\alpha$  řídí buněčnou proliferaci a diferenciaci a vykazuje potenciální protizánětlivé účinky u AD, což bylo demonstrováno na myších.<sup>36, 176</sup> Navíc malá klinická studie s pacienty s AD, kteří byli topicky léčeni pomocí PPAR $\alpha$  agonisty, klofibrátu, ukázala na signifikantní snížení závažnosti nemoci a snížení hladin chemokinů po dvou týdnech topické aplikace.<sup>177</sup> Avšak specifické účinky na lidskou kožní bariéru zatím nejsou plně pochopeny.

Proto jsme v této studii zkoumali účinky selektivního PPAR $\alpha$  agonisty, WY14643, selektivního PPAR $\gamma$  agonisty, ciglitazonu, a duálního agonisty PPAR $\alpha$ + $\gamma$ , DHA, v normálních a filaggrin deficitních kožních modelech. Filaggrin deficitní modely jsou charakterizovány porušenou maturací, diferenciací keratinocytů a zvýšenou kožní dráždivostí.<sup>178-179</sup> V naší nedávné studii jsme sledovali dopad nedostatku filaggrinu na kožní lipidy a našli jsme signifikantně zvýšenou expresi NHE-1, sekretorní lipázy A<sub>2</sub> a v důsledku toho zvýšené hladiny mastných kyselin v knock down modelech, přispívající k porušené bariérové funkci modelů.<sup>180</sup> Přítomnost PPAR byla dříve prokázána v rekonstruované kůži a byla popsána zvýšená exprese filaggrinu po suplementaci PPAR agonisty v normálních modelech.<sup>171, 181</sup> Zde jsme poprvé dokázali, že tato upregulace také funguje ve filaggrin deficitních kožních modelech po suplementaci DHA a WY14643. Selektivní stimulace PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$  také zvýšila expresi involucrinu a lorikrinu – dalších důležitých strukturních proteinů korneocytální obálky. DHA byla v tomto případě bez účinku. Společně s předchozími zjištěními jsme také pozorovali ztluštění SC po suplementaci DHA a WY14643<sup>170-171</sup> a zvýšení tloušťky epidermis po WY14643.

Co se týče kožních lipidů, potvrdili jsme předchozí zjištění, že kožní modely s deficitem filaggrinu vykazují nižší uspořádání lipidových řetězců a porušený poměr hlavních bariérových lipidů (mastné kyseliny: Cer: Chol) v porovnání s *WT* modely.<sup>180</sup> Po aplikaci DHA a WY14643 na *FLG siRNA* modely se hladina mastných kyselin ve SC snížila, což vedlo k úpravě poměru lipidů a uspořádání lipidových řetězců podobně jako u *WT* modelu. PPAR $\gamma$  agonista, ciglitazon, který nebyl schopen upregulovat filaggrin neměnil profil lipidů SC v *FLG siRNA*.

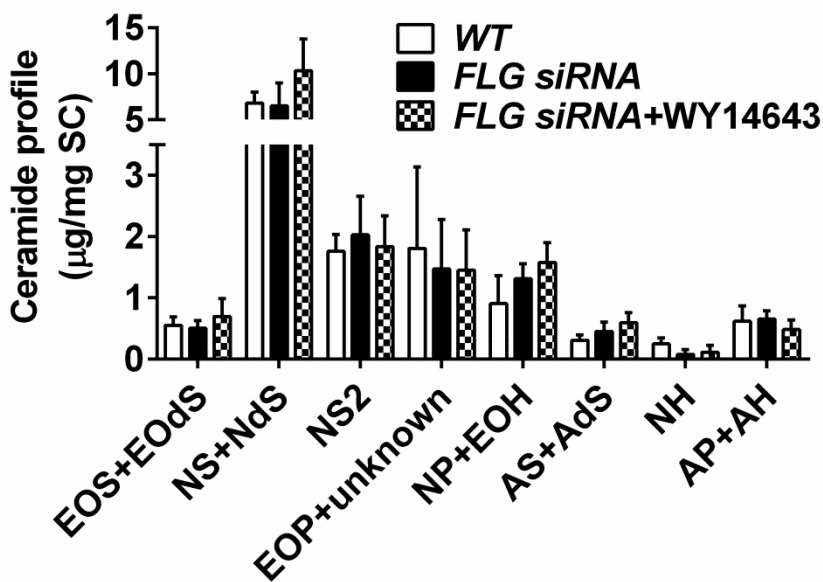


Obrázek 33. Účinky DHA, WY14643 a ciglitazonu na profily lipidů SC v normálních (WT) a filaggrin deficitních (FLG siRNA) kožních modelech v porovnání s lidským SC (hSC). Lipidy SC byly extrahovány z kožních modelů a byly analyzovány pomocí HPTLC pro zjištění obsahu bariérových lipidů (FFA – volné mastné kyseliny, Chol – cholesterol, Cer – ceramidy, CholS – cholesteryl-sulfát) a jejich prekurzorů (SM – sfingomyelin, PL – fosfolipidy, GCer – glucosylceramidy). Profily mastných kyselin byly stanoveny pomocí HPLC na reverzní fázi po převedení na naphthacyl estery. Průměr ± SEM, n ≥ 3 dávky, \* označuje statistickou významnost ( $p \leq 0,05$ ), *h* označuje statisticky významný rozdíl oproti hSC ( $p \leq 0,05$ ).

Abychom získali jasnější pohled na změny v profilech mastných kyselin, způsobené WY14643 a DHA, respektive, jak může zvýšená hladina mastných kyselin snižovat uspořádání lipidových řetězců, stanovili jsme poměry velmi dlouhých mastných kyselin (s 20 C a více) a kratších mastných kyselin (s 18 C a méně) nebo nenasycených mastných kyselin. Mastné kyseliny ve všech modelech obsahovaly především (>70 %) kratší a nenasycené řetězce, což může vysvětlovat snížené uspořádání lipidů v porovnání s lidským SC. Tento narušený profil mastných kyselin v kožních modelech v porovnání s lidským SC

souhlasí s publikovanými daty.<sup>42</sup> V *FLG siRNA* modelech se poměr velmi dlouhých mastných kyselin neměnil v porovnání s *WT*, ale hladiny kratších nebo nenasycených mastných kyselin byly zvýšeny. Toto opět souhlasí s nižším uspořádáním lipidových řetězců u *FLG siRNA* v porovnání s *WT* a s našimi předchozími zjištěními.<sup>180</sup> Zvýšená hladina kratších a nenasycených mastných kyselin byla dříve nalezena u pacientů s AD (ačkoliv bez spojitosti s mutací filaggrinu) a jejich negativní efekt na uspořádání lipidů byl také prokázán.<sup>90</sup> Léčba *FLG siRNA* modelů pomocí WY14643 (a také pomocí DHA, ale bez statistické významnosti) snižovala hodnoty krátkých a nenasycených mastných kyselin na hodnoty, pozorované u *WT* modelů. Tudíž se poměr kožních lipidů a také organizace kožních lipidů signifikantně zlepšila (Obrázek 33).

Je dobře známo, že stimulace PPAR receptorů ovlivňuje metabolismus kožních lipidů. Rivier a spoluautoři našli na dávce závislé zvýšení hladin Cholesterolu a Cer v rekonstruovaných kožních modelech po suplementaci PPAR $\alpha$  agonistou, WY14643.<sup>171</sup> Při stejné koncentraci WY14643, kterou zde používáme, pozorovali částečně (ale nesignifikantně) zvýšené hladiny Cer (obzvláště Cer NS) a Cholesterolu, což je velmi podobné našim zjištěním. Nepozorovali jsme však žádné změny v obsahu ostatních podtříd Cer, včetně acylCer (Obrázek 34).



Obrázek 34. Profily Cer ve *WT* a *FLG siRNA* rekonstruovaných kožních modelech a *FLG siRNA* rekonstruované kůži léčené WT14643. Průměr  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$ .

Nepozorovali jsme žádné negativní působení DHA na ostatní skupiny kožních lipidů. To je pozoruhodné, protože (topická) aplikace mastných kyselin může nepříznivě ovlivnit formování lamelárních tělísek a funkci kožní bariéry.<sup>182</sup>

Nakonec byly zkoumány účinky PPAR agonistů na funkci kožní bariéry. U WY14643 byla pozorována signifikantně snížená permeabilita pro modelovou látku (testosteron), což naznačuje zlepšení kožní bariéry. Zajímavé je, že i přes upregulaci filaggrinu, ztlustění SC a úpravu poměru kožních lipidů, nebyla kožní bariéra pomocí DHA zlepšena. Možné vysvětlení může být apoptotické působení DHA na proliferující buňky, což znesnadňuje epidermální diferenciaci,<sup>183</sup> nebo nedostatečný účinek na expresi involucrinu a lorikrinu.

Neúčinnost ciglitazonu, která byla pozorována v naší studii, byla ve shodě s dříve publikovanými výsledky ve zdravých<sup>184</sup> a atopických myších modelech<sup>176</sup> a může být vysvětlena jeho poměrně nízkou afinitou k PPAR $\gamma$  receptoru.<sup>175</sup> Přesto aktivace PPAR $\gamma$  vedla k účinnému potlačení imunitních odpovědí zprostředkovaných dendritickými buňkami a jaderným faktorem  $\kappa$ B,<sup>37-38</sup> což naznačuje silné protizánětlivé působení, ale toto zatím není možné studovat v rekonstruovaných kožních modelech.

Závěrem, účinky PPAR agonistů na kožní bariéru byly zkoumány na filaggrin deficitní kůži poprvé. Ve shodě s předchozími studiemi agonista PPAR $\alpha$ , WY14643, upreguloval filaggrin a napomáhal diferenciaci kůže. Navíc se nám podařilo dokázat, že WY14643 normalizoval narušený profil mastných kyselin, který se nacházel ve filaggrin deficitním modelu, redukcí hladin krátkých a nenasycených mastných kyselin na hodnoty nalezené v kontrolních kožních modelech, což nakonec vedlo k signifikantně zlepšené bariérové funkci kůže. PPAR $\gamma$  agonista, ciglitazon, a duální agonista, DHA, selhaly při zlepšení bariérové funkce kůže.

## 6. Závěr

Acylceramidy jsou dlouho považovány za esenciální komponenty lipidové kožní bariéry. Jejich deficit je spojován s některými kožními onemocněními, jako je atopická dermatitida, psoriáza nebo lamelární ichtyóza. Tyto ceramidy jsou zodpovědné za tvorbu dlouhé periodické lamelární fáze, což je jeden z předpokladů správného fungování kožní bariéry. Hlubšímu prozkoumání těchto látek brání jejich komerční nedostupnost a náročná izolace.

Tato práce měla několik dílčích cílů. Prvním cílem této práce bylo připravit všechny lidské acylceramidy, vyskytující se v kůži. Pro přípravu těchto látek byla nalezena a optimalizována syntetická cesta, která umožnila připravit všechny acylceramidy (ceramidy EOS, EOP, EODS a EOH) ve dvanácti krocích s celkovým výtěžkem 7 – 11 % (v závislosti na množství reaktantů). Klíčovými kroky tohoto postupu byla Wittigova reakce (umožnila tvorbu ultra-dlouhého řetězce), použití sukcinimidylesteru (zvýšil rozpustnost jinak těžko rozpustných látek, sloužil jako chránící skupina při  $\omega$ -esterifikaci a umožnil snadnou tvorbu amidové vazby v závěrečném kroku) a Yamaguchiho esterifikační reakce (s vysokým výtěžkem použita pro  $\omega$ -esterifikaci jinak velmi nereaktivních látek). Struktura těchto ultra-dlouhých ceramidů byla potvrzena pomocí pokročilých NMR experimentů a jejich přítomnost v kůži byla dokázána pomocí HPTLC.

Dalším cílem bylo zjistit, jak koncentrace a struktura acylceramidů ovlivňují permeabilitu a lipidovou organizaci modelových kožních lipidových membrán. Náš jednoduchý model, složený z jednoho ceramidu, jednoho acylceramidu, jedné mastné kyseliny, cholesterolu a cholesteryl-sulfátu, blízce napodoboval lamelární a laterální organizaci lipidů: dlouhá periodická fáze se začala formovat při 10 % koncentraci ceramidu EOS. Avšak permeability těchto membrán s ceramidem EOS byly překvapivě vyšší než kontrola. Poté jsme připravili složitější model, který připomínal složení lidského *stratum corneum* mnohem lépe. V komplexním modelu přídavek 10 % acylceramidů očekávaně snížil permeabilitu membrán v porovnání s kontrolou bez acylceramidů. Membrány s ceramidem EOP (založeném na fytosfingosinu) a ceramidem EODS (založeném na dihydrosfingosinu) byly méně propustné v porovnání s ceramidem EOS a směsí tří acylceramidů. Avšak pokusy s rentgenovou difrakcí ukázaly, že tyto nejméně propustné membrány neměly ani dlouhou periodickou fázi, ani orthorhombické uspořádání. Orthorhombické uspořádání bylo podporováno ceramidem EOS, zatímco dlouhá periodická fáze se tvořila pouze v membráně s ceramidem EO-mix. Zjistili jsme, že heterogenita lipidů je velmi důležitá - pouze nejkompexnější model s 9 ceramidovými podtřídami napodoboval jak organizaci, tak i permeabilitu lipidových membrán *stratum corneum*.



Cílem bylo také využít připravené acylceramidy pro zlepšení kvantitativní analýzy lipidů z kožních vzorků a kožních modelů atopické dermatitidy. Účinky PPAR agonistů na kožní bariéru byly zkoumány na filaggrin deficitní kůži poprvé. Ve shodě s předchozími studiemi agonista PPAR $\alpha$ , WY14643, upreguloval filaggrin a napomáhal diferenciaci kůže. Navíc se nám podařilo dokázat, že WY14643 normalizoval narušený profil mastných kyselin, který se nacházel ve filaggrin deficitním modelu, redukcí hladin krátkých a nenasycených mastných kyselin na hodnoty nalezené v kontrolních kožních modelech, což nakonec vedlo k signifikantně zlepšené bariérové funkci kůže.

Posledním cílem bylo připravit některé deriváty ceramidů (ceramid-1-fosfáty a modifikovaný gangliosid GM1). Ceramid-1-fosfát založený na sfingosinu a dihydrosfingosinu byl připraven ve 3 krocích v celkovém výtěžku 34 % a 45 % s využitím mezifázové fosforylace. Modifikovaný gangliosid GM1 byl připraven z přírodního pomocí enzymatické deacylace následované acylací kyselinou s kratším řetězcem v celkovém výtěžku 40 %. Tyto deriváty budou použity pro studium jejich úlohy v buněčné signalizaci a v lipidových membránách (ceramid-1-fosfáty) a jako standardy pro kvantitativní analýzu biologického materiálu (gangliosid).

## 7. Experimentální část

### 7.1. Chemikálie

Organická rozpouštědla, použitá při syntéze, byla získána od společnosti PENTA (Praha, Česká republika). Rozpouštědla pro analýzu, v HPLC kvalitě, byla získána od společnosti Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Veškeré chemikálie byly získány od zavedených dodavatelů: Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo), Acros (Geel, Belgie) nebo Merck (Darmstadt, Německo) a byly použity bez dalšího čištění. Cer NH a 6-hydroxysfingosin byly připraveny modifikovaným postupem popsáným v literatuře.<sup>185-187</sup> Cer NS (*N*-lignoceroyl sfingosin), NP (*N*-lignoceroyl fytosfingosin), AS (*N*-((*R*)-2-hydroxylignoceroyl sfingosin) a AP (*N*-((*R*)-2-hydroxylignoceroyl fytosfingosin) byly koupeny od Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Cer NdS (*N*-lignoceroyl dihydrosfingosin) a Cer AdS (*N*-((*R*)-2-hydroxylignoceroyl dihydrosfingosin) byly připraveny acylací dihydrosfingosinu lignocerovou kyselinou (LA) nebo 2-hydroxylignocerovou kyselinou s použitím *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu (WSC) v přítomnosti *N*-hydroxysukcinimidu. Lignocerová kyselina, dokosanová kyselina, eikosanová kyselina, oktadekanová kyselina, hexadekanová kyselina, Chol z lanolinu, CholS, theofylin (TH), indometacin (IND), gentamicin sulfát, dodekahydrát dihydrogenfosforečnanu sodného a propylen glykol byly zakoupeny od Sigma-Aldrich Chemie (Schnelldorf, Německo). Nuclepore<sup>TM</sup> polykarbonátové membrány s velikostí pórů 0,015 μm byly zakoupeny od Whatman (Kent, Maidstone, USA). Voda byla přečištěna s použitím Milli-Q systému (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

### 7.2. Potvrzení struktury a čistoty připravených látek

TLC bylo provedeno na hliníkových fóliích pokrytých silikagelem 60 F254. Pro sloupcovou chromatografii byl použit Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). TLC bylo vizualizováno pomocí směsi kyseliny fosfomolybdenové a síranu ceričitého v kyselině sírové, následované zahřátím na 220 °C.

Teplota tání byla měřena pomocí Koflerova mikroskopu a je nekorigovaná. Infračervená spektra byla měřena na přístroji Nicolet 6700 v ATR módu (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a 2D NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500 (Palo Alto, CA, USA). Chemické posuny jsou udány jako hodnota δ v ppm a jsou nepřímo vztaheny k tetramethylsilanu (TMS) pomocí signálu rozpouštědla. Elementární analýza byla provedena na přístroji Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar

Analysensysteme GmbH, Hanau, Německo). Matrix-assisted light desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) hmotnostní spektra byly zaznamenány v pozitivním módu na 4800 MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometru (AB Sciex, Framingham, MA). Matrice 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis Cedex, France) nebo 6-aza-2-thiothymin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo) byly rozpuštěny na koncentraci 10mg/ml v 50% MeOH s 0,1% přídatkem trifluoroctové kyseliny. Obě matrice byly připraveny s přídatkem a bez přídatku diammonium hydrogencitrátu (5 mM) pro potlačení tvorby adduktů. Vysoce rozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) byla měřena na přístroji Synapt G2 (Waters, Milford, USA). Optická otáčivost byla měřena na přístroji Krüss optronic P3000 (Krüss GmbH, Hamburg, Německo).

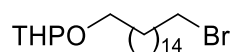
### 7.3. Syntéza ultra-dlouhých ceramidů

#### 16-Bromhexadekanol (**1**)



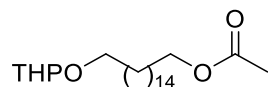
16-Bromhexadekanová kyselina (30 g, 89,4 mmol) byla rozpuštěna ve 180 ml suchého THF a ochlazena ledem na 0 °C. Do tohoto roztoku bylo pomalu přidáno 108 ml (108 mmol) 1M BH<sub>3</sub>-THF, teplota byla pomalu zvýšena na laboratorní a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 h pod argonovou atmosférou. Po 24 h byla reakční směs odpařena na vakuu a zbytek byl rozpuštěn v MeOH a znovu odpařen pro odstranění zbytků boranu. Tento proces byl opakován třikrát a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím Hex/EtOAc 9:1 s 0,5% přídatkem octové kyseliny. **Výtěžek:** 27,80 g (97 %) látky **1** jako bílá krystalická látka. **Teplota tání** 52 – 53 °C, literatura 53 – 54 °C.<sup>188-189</sup> **TLC** (Hex/EtOAc 9:1 s 0,5% kyseliny octové), *R<sub>f</sub>* = 0,24. **IR** 3267, 2920, 2850, 1473, 720 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.63 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, HO-CH<sub>2</sub>), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, Br-CH<sub>2</sub>), 1.91 – 1.78 (m, 2H, Br-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.62 – 1.50 (m, 2H, HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.19 (m, 24H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 63.06, 34.05, 32.82, 32.79, 29.62, 29.59, 29.57, 29.52, 29.41, 28.75, 28.16, 25.72. **Elementární analýza:** C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>BrO (321,34) Vypočteno: C 59.80 H 10.35, nalezeno: C 59.44 H 10.41.

#### 2-((16-Bromhexadecyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran (**4**)



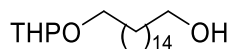
Sloučenina **1** (27,8 g, 86,5 mmol) byla smíchána s 885 mg (35,2 mmol) pyridinium *p*-toluensulfonátem a vysušena na vakuu. Tato směs byla rozpuštěna v 315 ml suchého CHCl<sub>3</sub> a bylo přidáno 15,8 ml (173 mmol) 3,4-dihydro-2H-pyranu. Reakční směs byla zahřívána na reflux po dobu 3 h pod argonovou atmosférou. Reakce byla ukončena přidavkem 500 ml vody a extrahována CHCl<sub>3</sub> (2 × 300 ml). Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím Hex/EtOAc 30:1. **Výtěžek:** 34,13 g (97 %) látky **4** jako bezbarvý olej. **Teplota tání** 24 – 25 °C, literatura 26 – 27 °C.<sup>190</sup> **TLC** (Hex/EtOAc 9:1), *R<sub>f</sub>* = 0.51. **IR** 2924, 2853, 1466 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.57 (dd, *J* = 4.4, 2.7 Hz, 1H, O-CH-O), 3.92 – 3.81 (m, 1H, O-CH), 3.77 – 3.64 (m, 1H, O-CH), 3.54 – 3.44 (m, 1H, O-CH), 3.42 – 3.32 (m, 3H, Br-CH<sub>2</sub>, O-CH), 1.91 – 1.77 (m, 3H), 1.64 – 1.47 (m, 6H), 1.44 – 1.16 (m, 25H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 98.81, 67.67, 62.31, 34.04, 32.82, 30.76, 29.73, 29.62, 29.58, 29.51, 29.47, 29.41, 28.74, 28.15, 26.21, 25.48, 19.68. Ve shodě s literaturou.<sup>190</sup>

#### 16-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadecyl-acetát (**5**)



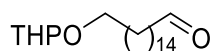
Sloučenina **4** (34,13 g, 84,2 mmol) byla rozpuštěna v 700 ml DMF a bylo přidáno 8,29 g (101 mmol) octanu sodného. Reakční směs byla zahřívána na 90 °C po dobu 6 h. Po ochlazení byl DMF částečně odpařen (na přibližně 300 ml), byl přidán CHCl<sub>3</sub> a reakční směs byla extrahována vodou (4 × 300 ml) pro odstranění DMF a nezreagovaného octanu. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím Hex/EtOAc 25:1. **Výtěžek:** 30,42 g (94 %) sloučeniny **5** jako bezbarvý olej. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1), *R<sub>f</sub>* = 0.49. **IR** 2919, 2851, 1731, 1479. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.56 (dd, *J* = 4.6, 2.7 Hz, 1H, O-CH-O), 4.03 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>), 3.91 – 3.80 (m, 1H, O-CH), 3.77 – 3.66 (m, 1H, O-CH), 3.53 – 3.43 (m, 1H, O-CH), 3.42 – 3.31 (m, 1H, O-CH), 2.03 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 1.88 – 1.64 (m, 2H), 1.64 – 1.44 (m, 8H), 1.39 – 1.16 (m, 24H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.18, 98.78, 67.65, 64.62, 62.28, 30.75, 29.72, 29.71, 29.62, 29.60, 29.57, 29.53, 29.48, 29.45, 29.22, 28.56, 26.21, 25.87, 25.47, 19.66. **HRMS:** C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> [M + Na]<sup>+</sup> Vypočteno: 407.3132, nalezeno: 407.3134.

16-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekan-1-ol (**6**)



Sloučenina **5** (30,42 g, 79,1 mmol) byla rozpuštěna ve 100 ml suchého THF a ochlazena na 0 °C. Poté bylo pomalu přidáno 197,8 ml (197,8 mmol) 1M roztoku LiAlH<sub>4</sub> v THF pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla pomalu zahřata na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Reakce byla ukončena velmi pomalým přidáním vody a extrahována do CHCl<sub>3</sub> (3 × 150 ml). Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím Hex/EtOAc 7:1. **Výtěžek:** 22,27 g (82 %) sloučeniny **6** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 36 – 37 °C, literatura 72 – 73 °C.<sup>191</sup> Přestože se teplota tání o tolik liší oproti literatuře, ostatní spektroskopické data potvrzují strukturu i čistotu produktu **6**. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1), *R<sub>f</sub>* = 0.13, (Hex/EtOAc 3:1), *R<sub>f</sub>* = 0.44. **IR** 3424, 2922, 2850, 1469, 724 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.57 (dd, *J* = 4.5, 2.7 Hz, 1H, O-CH-O), 3.94 – 3.79 (m, 1H, O-CH), 3.78 – 3.66 (m, 1H, O-CH), 3.62 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, HO-CH<sub>2</sub>), 3.55 – 3.43 (m, 1H, O-CH), 3.42 – 3.30 (m, 1H, O-CH), 1.92 – 1.63 (m, 2H), 1.62 – 1.44 (m, 8H), 1.42 – 1.14 (m, 24H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 98.80, 67.68, 63.03, 63.02, 62.30, 32.78, 30.74, 29.72, 29.65, 29.61, 29.57, 29.46, 29.41, 29.40, 26.21, 25.71, 25.47, 19.66. **Elementární analýza:** C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub> (342.56) Vypočteno: C 73.63 H 12.36, nalezeno: C 73.27 H 12.73.

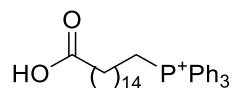
16-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekanal (**7**)



3,85 ml (44,8 mmol) (COCl)<sub>2</sub> bylo rozpuštěno v 200 ml DCM pod argonovou atmosférou a ochlazeno na -55 °C. Suchý DMSO (7,04 ml, 99,1 mmol) byl rozpuštěn ve 100 ml suchého DCM a tento roztok byl přidán k roztoku (COCl)<sub>2</sub>. Po 10 minutách bylo pomalu přidáno 11 g (32,1 mmol) sloučeniny **6** ve 100 ml suchého DCM a reakční směs byla míchána ještě 1,5 h při -55 °C. Poté bylo přidáno 13,75 ml (98,6 mmol) suchého TEA, teplota byla pomalu zvýšena na laboratorní a reakční směs byla míchána přes noc pod argonovou atmosférou. Reakce byla ukončena přidávkem roztoku NaCl (300 ml) a extrahována do CHCl<sub>3</sub> (3 × 150 ml). Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím Hex/EtOAc 15:1. **Výtěžek:** 9,40 g (86 %) sloučeniny **7** jako bezbarvý olej. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1), *R<sub>f</sub>* = 0.46. **IR** 2923, 2852, 1727, 1464 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.75 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, CO-H), 4.56 (dd, *J* = 4.5, 2.7 Hz, 1H, O-CH-O), 3.91 – 3.78 (m, 1H, O-CH), 3.77 – 3.65 (m, 1H, O-CH), 3.53 – 3.42 (m, 1H, O-CH), 3.42 – 3.26 (m, 1H, O-CH), 2.41 (td, *J* = 7.3, 1.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CO), 1.91 – 1.64 (m, 2H), 1.61 – 1.47 (m, 8H), 1.42 – 1.13 (m, 22H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.91, 98.79, 67.66,

62.29, 43.88, 30.75, 29.72, 29.62, 29.61, 29.59, 29.57, 29.54, 29.46, 29.39, 29.32, 29.25, 29.22, 29.13, 26.21, 25.48, 19.66. **HRMS:** C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub> [M + Na]<sup>+</sup> Vypočteno: 363.2870, nalezeno: 363.2878.

(15-Karboxypentadecyl)trifenylfosfonium-bromid (**8**)



16-Bromhexadekanová kyselina (20 g, 59,6 mmol) byla smíchána s 16 g (61 mmol) trifenylfosfinu. Reakční směs byla míchána při 140 °C bez rozpouštědla (jako tavenina) 30 h. Po ochladnutí byla želatinovitá látka rozpuštěna v minimálním množství CHCl<sub>3</sub> a nalita do alespoň trojnásobného množství diethyleteru. Suspenze byl ponechána 2 h při -20 °C a poté odfiltrována. Tato precipitace byla opakována ještě dvakrát. **Výtěžek:** 34,33 g (96 %) sloučeniny **8** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 103 – 104 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1), *R<sub>f</sub>* = 0.00, (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1), *R<sub>f</sub>* = 0.30. **IR** 2922, 2850, 1715, 1464, 1437, 1113, 691 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.84 – 7.74 (m, 9H, Ar-H), 7.73 – 7.63 (m, 6H, Ar-H), 3.77 – 3.47 (m, 2H, P<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 2.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 1.75 – 1.42 (m, 6H), 1.35 – 0.98 (m, 20H). **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177.78, 134.99 (d, *J* = 3.0 Hz), 133.54 (d, *J* = 10.0 Hz), 130.46 (d, *J* = 12.5 Hz), 118.19 (d, *J* = 85.9 Hz), 34.26, 30.35 (d, *J* = 15.6 Hz), 29.30, 29.17, 29.05, 28.88, 24.69, 22.96, 22.55, 22.49, 22.30. **Elementární analýza:** C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>BrO<sub>2</sub>P (597.61) Vypočteno: C 68.33 H 7.76, nalezeno: C 68.12 H 8.05.

(*E/Z*)-32-((Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)dotriakont-16-enová kyselina (**9**)



Sloučenina **8** (17,1 g, 28,6 mmol) byla rozsuspendována v 250 ml suchého THF pod argonovou atmosférou a ochlazena na -20 °C. 1M bis(trimethylsilyl)amid sodný (65,6 ml, 65,6 mmol) v THF byl přidán a roztok byl ještě 30 minut míchán při -20 °C. Teplota byla pomalu zvýšena na laboratorní a posléze až na reflux po dobu 1 h. Vzniklá oranžová suspenze byla ochlazena na -20 °C a bylo pomalu přidáno 9,40 g (27,6 mmol) aldehydu **7** ve 150 ml suchého THF. Chlazení pokračovalo dalších 30 minut, poté byla reakční směs zahřáta na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Reakce byla ukončena přidávkem 300 ml nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl a okyselena koncentrovanou HCl na pH 1. Extrakce do CHCl<sub>3</sub> (3

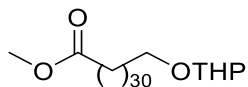
× 300 ml) byla následována sloupcovou chromatografií, nejprve Hex/EtOAc 15:1 a po tom, co byl odpláchnut veškerý nezreagovaný aldehyd, bylo přidáno 0,5 % kyseliny octové do mobilní fáze. **Výtěžek:** 6,05 g (38 %) sloučeniny **9** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 47 – 48.5 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1 s 0,5 % kyseliny octové),  $R_f = 0.20$  a 0.24 (jako dvě skvrny). **IR** 2918, 2850, 1713, 1472  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.36 (m, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 4.60 (dd,  $J = 4.4, 2.8$  Hz, 1H, O-CH-O), 3.92 – 3.84 (m, 1H, O-CH), 3.77 – 3.69 (m, 1H, O-CH), 3.55 – 3.47 (m, 1H, O-CH), 3.43 – 3.34 (m, 1H, O-CH), 2.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 2.05 – 1.98 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2$ ), 1.89 – 1.79 (m, 2H), 1.77 – 1.67 (m, 2H), 1.66 – 1.49 (m, 8H), 1.41 – 1.16 (m, 44H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.98, 129.88, 98.80, 67.71, 62.28, 33.90, 30.76, 29.76, 29.74, 29.68, 29.66, 29.65, 29.63, 29.62, 29.60, 29.59, 29.55, 29.52, 29.49, 29.44, 29.31, 29.24, 29.07, 27.20, 26.23, 25.50, 24.70, 19.65. **Elementární analýza:**  $\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  (587.96) Vypočteno: C 75.58 H 12.17, nalezeno: C 75.30 H 12.40.

Methyl-(*E/Z*)-32-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)dotriakont-16-enoát (**10**)



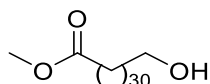
Sloučenina **9** (400 mg, 0,69 mmol) byla smíchána s 102 mg (0,83 mmol) 4-dimethylaminopyridinu, rozpuštěna v 20 ml suchého DCM a ochlazena na 0 °C. Poté byl přidán WSC (306  $\mu\text{l}$ , 1,73 mmol) a 10 ml suchého MeOH a reakční směs byla zahřívána na reflux po dobu 5 h pod argonovou atmosférou. Reakce byla ukončena 10 ml 10% HCl a extrahována do  $\text{CHCl}_3$  (3 × 20 ml). Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím Hex/EtOAc 25:1. **Výtěžek:** 192 mg (47 %) sloučeniny **10** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 40 – 41 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1),  $R_f = 0.56$ . **IR** 2917, 2849, 1736, 1472  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.40 – 5.31 (m, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 4.59 (dd,  $J = 4.5, 2.8$  Hz, 1H, O-CH-O), 3.93 – 3.83 (m, 1H, O-CH), 3.78 – 3.69 (m, 1H, O-CH), 3.68 (s, 3H,  $\text{COO-CH}_3$ ), 3.55 – 3.47 (m, 1H, O-CH), 3.44 – 3.33 (m, 1H, O-CH), 2.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CO-CH}_2$ ), 2.08 – 1.95 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2$ ), 1.89 – 1.78 (m, 1H), 1.77 – 1.67 (m, 1H), 1.66 – 1.47 (m, 8H), 1.41 – 1.19 (m, 46H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.31, 130.33, 129.87, 98.81, 67.68, 62.31, 51.41, 34.10, 32.60, 30.77, 29.76, 29.71, 29.67, 29.64, 29.59, 29.56, 29.53, 29.49, 29.45, 29.31, 29.25, 29.17, 29.14, 27.20, 26.24, 25.50, 24.95, 19.69. **Elementární analýza:**  $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{O}_4$  (592.99) Vypočteno: C 76.97 H 12.24, nalezeno: C 76.61 H 12.56.

### Methyl-32-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)dotriakontanoát (**11**)



Sloučenina **10** (192 mg, 0,32 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml EtOAc, byl přidán 1 mg (0,01 mmol) Pd/C (10 % w/w) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod atmosférou vodíku přes noc. Poté byl přidán CHCl<sub>3</sub>, dokud se celá vykrystalizovaná látka nerozpustila a paládiový katalyzátor byl odfiltrován. Rozpouštědla byla odpařena a tuto látku bylo možné použít do dalšího kroku bez čištění. Pro přečištění je možné použít sloupcovou chromatografii Hex/EtOAc 10:1. **Výtěžek:** 173 mg (90 %) sloučeniny **11** jako bílá voskovitá látka. **Teplota tání** 69 – 71 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1),  $R_f = 0.55$ . **IR** 2918, 2849, 1741, 1473 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.59 (dd,  $J = 4.5, 2.9$  Hz, 1H, O-CH-O), 3.95 – 3.83 (m, 1H, O-CH), 3.78 – 3.70 (m, 1H, O-CH), 3.68 (s, 3H, COO-CH<sub>3</sub>), 3.55 – 3.46 (m, 1H, O-CH), 3.43 – 3.35 (m, 1H, O-CH), 2.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 1.90 – 1.79 (m, 1H), 1.78 – 1.68 (m, 1H), 1.67 – 1.47 (m, 10H, překryto H<sub>2</sub>O), 1.41 – 1.18 (m, 52H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.31, 98.82, 67.69, 62.31, 51.40, 34.11, 30.78, 29.75, 29.69, 29.66, 29.63, 29.60, 29.58, 29.48, 29.44, 29.24, 29.14, 26.23, 25.51, 24.95, 19.69. **Elementární analýza:** C<sub>38</sub>H<sub>74</sub>O<sub>4</sub> (595.01) Vypočteno: C 76.71 H 12.54, nalezeno: C 76.48 H 12.87.

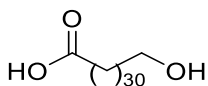
### Methyl-32-hydroxydotriakontanoát (**12**)



Sloučenina **11** (173 mg, 0,29 mmol) byla smíchána se 126 mg (0,73 mmol) monohydrátu *p*-toluensulfonové kyseliny a rozsuspendována v 12 ml MeOH. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 48 h. MeOH byl odpařen, odparek byl rozpuštěn v 20 ml CHCl<sub>3</sub> a extrahován vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (1 × 20 ml). CHCl<sub>3</sub> frakce byla odpařena a rekrystalizována ze směsi CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:10. **Výtěžek:** 135 mg (91 %) sloučeniny **12** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 95 – 96 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1),  $R_f = 0.18$ . **IR** 2918, 2850, 1739, 1473 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 5:1, 40 – 50 °C)  $\delta$  3.55 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.46 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, HO-CH<sub>2</sub>), 2.19 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 1.58 – 1.46 (m, 2H), 1.45 – 1.37 (m, 2H), 1.26 – 1.07 (m, 54H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 5:1, 40 – 50 °C)  $\delta$  174.95, 62.42, 51.47, 34.10, 32.51, 29.65, 29.63, 29.59, 29.54, 29.45, 29.40, 29.20, 29.09, 25.74, 24.90. **Elementární analýza:** C<sub>33</sub>H<sub>66</sub>O<sub>3</sub>·0.5 H<sub>2</sub>O (519.90) Vypočteno: C 76.24 H 12.99, nalezeno: C 76.32 H 13.21.

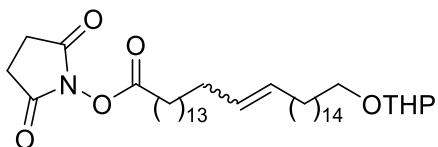


### 32-Hydroxydotriakontanová kyselina (13)



Sloučenina **12** (135 mg, 0,26 mmol) byla rozsuspodována v 12 ml MeOH. NaOH (104 mg, 2,6 mmol) byl přidán a reakční směs byla zahřívána na reflux po dobu 24 h. Po ochlazení byl MeOH odpařen a pevná látka byla rozsuspodována v 15 ml vody. Suspenze byla okyselena na pH 1 koncentrovanou HCl. Pevná látka byla odfiltrována a promyta 30 ml vody, poté byl surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií s použitím CHCl<sub>3</sub>/MeOH 20:1. **Výtěžek:** 115 mg (88 %) sloučeniny **13** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 108.5 – 110 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 6:1), *R<sub>f</sub>* = 0.00, (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1), *R<sub>f</sub>* = 0.33. **IR** 2918, 2849, 1738, 1462. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 5:1, 40 – 50 °C) δ 3.48 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 2.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 1.57 – 1.47 (m, 2H), 1.47 – 1.40 (m, 2H), 1.30 – 1.08 (m, 54H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 5:1, 40 – 50 °C) δ 178.52, 66.37, 55.09, 37.93, 36.43, 33.42, 33.37, 33.32, 33.23, 33.19, 33.04, 32.97, 32.95, 32.91, 29.57. **Elementární analýza:** C<sub>32</sub>H<sub>64</sub>O<sub>3</sub> (496.86) Vypočteno: C 77.36 H 12.98, nalezeno: C 77.09 H 13.20.

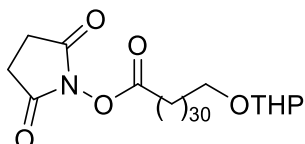
### Sukcinimid-1-yl-(E/Z)-32-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)dotriakont-16-enoát (**14**)



Sloučenina **9** (12,2 g, 21,1 mmol) byla dobře vysušena na vakuu a smíchána s 10,8 g (42,2 mmol) disukcinimidyl-karbonátu a rozpuštěna v 2000 ml suchého DCM při 0 °C. Byl přidán suchý diisopropylethyl amin (7,35 ml, 42,2 mmol), reakční směs byla zahřáta na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím Hex/EtOAc 6:1 s přidavkem 0,5 % kyseliny octové. **Výtěžek:** 9,17 g (64 %) sloučeniny **14** jako bílá pevná látka. Při použití menšího množství výchozí látky (do 100 mg) dosahuje výtěžek až 80 %. **Teplota tání** 63 – 65 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 3:1 s 0.5 % kyseliny octové), *R<sub>f</sub>* = 0.40. **IR** 2921, 2850, 1820, 1788, 1741, 1726, 1465 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.34 (m, 2H, CH=CH), 4.59 – 4.54 (m, 1H, O-CH-O), 3.93 – 3.80 (m, 1H, O-CH), 3.79 – 3.66 (m, 1H, O-CH), 3.54 – 3.43 (m, 1H, O-CH), 3.42 – 3.31 (m, 1H, O-CH), 2.83 (s, 4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 2.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.07 – 1.91 (m, 4H), 1.79 – 1.66 (m, 4H), 1.65 – 1.45 (m, 8H), 1.44 – 1.09 (m, 44H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.13, 168.66,

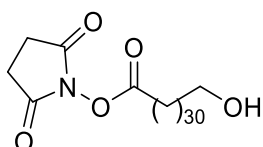
129.87, 98.81, 67.69, 62.31, 30.93, 30.78, 29.77, 29.75, 29.67, 29.65, 29.61, 29.60, 29.56, 29.49, 29.35, 29.32, 29.08, 28.79, 27.20, 26.23, 25.58, 25.50, 24.56, 19.69. **Elementární analýza:** C<sub>41</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>6</sub> · 0.5 H<sub>2</sub>O (685.05) Vypočteno: C 71.89 H 10.89 N 2.04, nalezeno: C 72.01 H 11.25 N 1.95.

#### Sukcinimid-1-yl-32-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)dotriakontanoát (**15**)



Sloučenina **14** (9,17 g, 13,6 mmol) byla rozpuštěna v 4,59 l EtOAc, bylo přidáno 430 mg (0,408 mmol) Pd/C (10 % w/w) a reakční směs byla intenzivně míchána při laboratorní teplotě pod atmosférou vodíku 50 h. Do vzniklé suspenze byl přidán CHCl<sub>3</sub> do rozpuštění veškeré látky a Pd/C katalyzátor byl odfiltrován. Po odpaření rozpouštědla byl surový produkt krystalizován z EtOAc. **Výtěžek:** 7,45 g (81 %) sloučeniny **15** jako bílá pevná látka. Při použití menšího množství výchozí látky (do 100 mg) je výtěžek téměř kvantitativní. **Teplota tání** 97 – 98.5 °C. **TLC** (Hex/EtOAc 3:1 s 0.5 % kyseliny octové), *R<sub>f</sub>* = 0.40. **IR** 2919, 2849, 1820, 1788, 1741, 1725, 1463 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.58 (dd, *J* = 4.5, 2.8 Hz, 1H, O-CH-O), 3.93 – 3.83 (m, 1H, O-CH), 3.78 – 3.68 (m, 1H, O-CH), 3.55 – 3.46 (m, 1H, O-CH), 3.43 – 3.33 (m, 1H, O-CH), 2.84 (s, 4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 2.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 1.89 – 1.67 (m, 2H), 1.64 – 1.49 (m, 4H), 1.45 – 1.19 (m, 58H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.11, 168.64, 98.80, 67.67, 62.29, 30.92, 30.77, 29.74, 29.68, 29.66, 29.64, 29.60, 29.58, 29.53, 29.47, 29.33, 29.06, 28.77, 26.22, 25.56, 25.49, 24.55, 19.68. **Elementární analýza:** C<sub>41</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>6</sub> (678.05) Vypočteno: C 72.63 H 11.15 N 2.07, nalezeno: C 72.38 H 11.53 N 2.00.

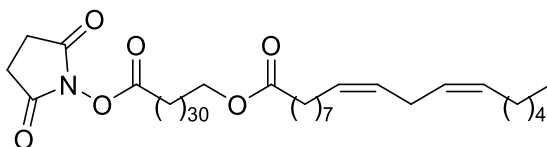
#### Sukcinimid-1-yl-32-hydroxydotriakontanoát (**16**)



Sloučenina **15** (7,45 g, 11,0 mmol) byla rozpuštěna v 335 ml MeOH. Bylo přidáno 6,28 g (33 mmol) *p*-toluensulfonové kyseliny a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Po odpaření MeOH byla pevná látka rozsuspendována ve 300 ml vody, odfiltrována a

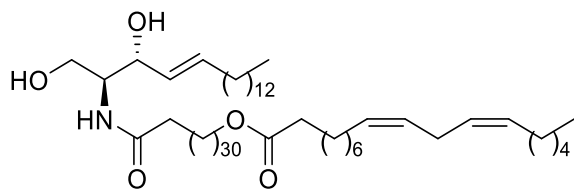
propláchnuta vodou do neutrálního pH. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s pomocí CHCl<sub>3</sub>/MeOH 100:1 až 50:1. **Výtěžek:** 4,91 g (75 %) sloučeniny **16** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 121.5 – 122.5 °C. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1), *R<sub>f</sub>* = 0.49. **IR** 2920, 2848, 1820, 1788, 1741, 1725, 1461 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 5:1) δ 3.47 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, HO-CH<sub>2</sub>), 2.71 (s, 4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 2.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 1.69 – 1.58 (m, 2H), 1.49 – 1.39 (m, 2H), 1.36 – 1.26 (m, 2H), 1.25 – 1.10 (m, 52H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) δ 169.42, 168.68, 62.36, 32.44, 30.73, 29.42, 29.36, 29.28, 29.22, 29.09, 28.82, 28.56, 25.58, 25.39, 24.39. **Elementární analýza:** C<sub>36</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>5</sub> (593.93) Vypočteno: C 72.80 H 11.37 N 2.36, nalezeno: C 72.65 H 11.78 N 2.25.

#### Sukcinimid-1-yl-32-(linoleoyloxy)dotriakontanoát (**17**)



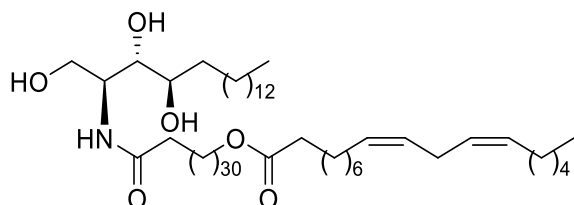
Sloučenina **16** (350 mg, 0,59 mmol) byla vysušena ve vakuu. Potom k ní byla přidána kyselina linolová (182 mg, 0,65 mmol) v 70 ml suchého THF pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla naředěna ještě 70 ml THF, byl přidán 2,4,6-trichlorbenzoyl chlorid (102 μl, 0,65 mmol), poté suchý TEA (205 μl, 1,47 mmol) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 2 minuty. Poté byl přidán 4-(dimethylamino)pyridin (43 mg, 0,35 mmol) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 40 h. Ze suspenze se postupně stal zakalený roztok. Po 40 h bylo přidáno 50 ml CHCl<sub>3</sub> do vyčeření roztoku, reakční směs byla naadsorbována na silikagel a produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s použitím CHCl<sub>3</sub>/MeOH 100:1. **Výtěžek:** 426 mg (84 %) sloučeniny **17** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 89 – 90 °C. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1), *R<sub>f</sub>* = 0.87. **IR** 2919, 2850, 1821, 1787, 1740, 1725, 1471 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.46 – 5.21 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 4.06 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>), 2.84 (s, 4H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 2.78 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 2.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CO), 2.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CO), 2.13 – 1.97 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1.82 – 1.69 (m, 4H), 1.67 – 1.58 (m, 4H), 1.45 – 1.18 (m, 66H), 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.94, 169.12, 168.65, 130.18, 130.02, 128.01, 127.88, 64.40, 34.39, 31.51, 30.94, 29.70, 29.66, 29.64, 29.62, 29.58, 29.55, 29.52, 29.35, 29.25, 29.16, 29.11, 29.08, 28.79, 28.65, 27.18, 25.93, 25.62, 25.58, 25.00, 24.56, 22.56, 14.06. **Elementární analýza:** C<sub>54</sub>H<sub>97</sub>NO<sub>6</sub> (856.37) Vypočteno: C 75.74 H 11.42 N 1.64, nalezeno: C 75.52 H 11.67 N 1.60.

*N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-Dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)-32-(linoleoyloxy)dotriakontanamid (**Cer EOS**)



Sloučenina **17** (150 mg, 0,18 mmol) byla smíchána se 79 mg (0,26 mmol) sfinhosinu a rozpuštěna v 30 ml suchého THF a 15 ml suchého DCM. Suchý diisopropylethylamin (94  $\mu$ l, 0,54 mmol) byl přidán a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod argonovou atmosférou 30 h. Po odpaření rozpouštědel byl surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií s pomocí  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  50:1. **Výtěžek:** 168 mg (92 %) **Cer EOS** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 84.5 – 85.5 °C. **TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1),  $R_f = 0.44$ .  $[\alpha]_D^{25} = 5.83$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). **IR** 3303, 2918, 2850, 1733, 1645, 1550, 1466  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.25 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, NH), 5.86 – 5.71 (m, 1H, CH(OH)-CH=CH), 5.59 – 5.47 (m, 1H, CH(OH)-CH=CH), 5.44 – 5.27 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 4.33 (m, 1H, CH(OH)), 4.06 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>), 4.00 – 3.87 (m, 2H, CH(NH)-CH<sub>2</sub>-OH), 3.76 – 3.65 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-OH), 2.78 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 2.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.25 – 2.16 (m, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.13 – 1.99 (m, 4H), 1.70 – 1.54 (m, 6H), 1.43 – 1.17 (m, 92H), 0.94 – 0.82 (m, 6H, CH<sub>3</sub>).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.99, 173.86, 134.25, 130.18, 130.02, 128.79, 128.00, 127.87, 74.67, 64.41, 62.50, 54.46, 36.83, 34.39, 32.27, 31.91, 31.51, 29.69, 29.67, 29.64, 29.61, 29.57, 29.52, 29.50, 29.48, 29.36, 29.34, 29.33, 29.28, 29.25, 29.21, 29.16, 29.10, 28.63, 27.18, 25.92, 25.74, 25.61, 24.99, 22.67, 22.56, 14.10, 14.05. **Elementární analýza:**  $\text{C}_{68}\text{H}_{129}\text{NO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1058.80) Vypočteno: C 77.14 H 12.47 N 1.32, nalezeno: C 77.30 H 12.55 N 1.27. **MALDI**  $[\text{M} + \text{H}]^+$  Vypočteno: 1041.00, nalezeno: 1040.98.

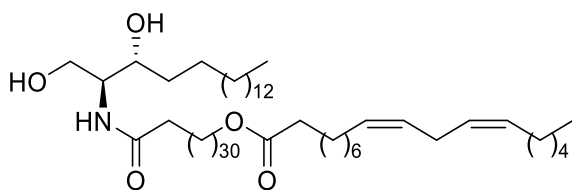
32-(linoleoyloxy)-*N*-((2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxyoktadecan-2-yl)dotriakontanamid (**Cer EOP**)



Sloučenina **17** (100 mg, 0,12 mmol) byla smíchána s 57 mg (0,18 mmol) fytosfinhosinu a rozpuštěna v 25 ml suchého THF a 10 ml suchého DCM. Suchý diisopropylethylamin (62,7  $\mu$ l, 0,36 mmol) byl přidán a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod

argonovou atmosférou 30 h. Po odpaření rozpouštědel byl surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií s pomocí CHCl<sub>3</sub>/MeOH 50:1. **Výtěžek:** 110 mg (89 %) **Cer EOP** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 106 – 107.5 °C. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1), *R<sub>f</sub>* = 0.38. **[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>** = -3.88 (c = 1, CHCl<sub>3</sub>). **IR** 3306, 2918, 2850, 1732, 1641, 1546, 1472 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.37 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 5.47 – 5.24 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 4.22 – 4.10 (m, 1H, CH(NH)), 4.06 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>), 3.91 (m, 1H, CH<sub>2</sub>(OH)), 3.73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>(OH)), 3.66 – 3.53 (m, 2H, CH(OH)-CH(OH)), 2.78 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 2.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.24 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.10 – 1.99 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1.84 – 1.70 (m, 2H), 1.70 – 1.56 (m, 8H), 1.56 – 1.42 (m, 2H), 1.43 – 1.16 (m, 88H), 0.95 – 0.82 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.64, 174.01, 130.20, 130.04, 128.02, 127.89, 72.61, 64.43, 61.94, 53.57, 36.65, 34.41, 33.45, 31.93, 31.52, 29.71, 29.67, 29.62, 29.53, 29.51, 29.35, 29.26, 29.18, 29.12, 28.65, 27.20, 25.94, 25.72, 25.63, 25.59, 25.01, 22.69, 22.57, 14.12, 14.07. **Elementární analýza:** C<sub>68</sub>H<sub>131</sub>NO<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O (1076.82) Vypočteno: C 75.85 H 12.45 N 1.30, nalezeno: C 76.04 H 12.55 N 1.19. **MALDI** [M + H]<sup>+</sup> Vypočteno: 1059.01, nalezeno: 1059.02.

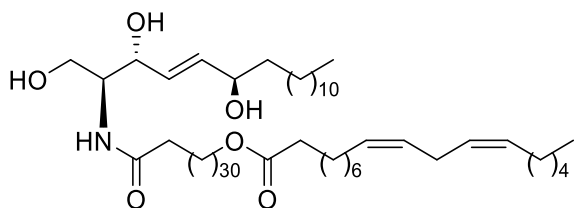
**N-((2S,3R)-1,3-Dihydroxyoktadekan-2-yl)-32-(linoleoyloxy)dotriakontanamid (Cer EODs)**



Sloučenina **17** (80 mg, 0,09 mmol) byla smíchána s 41 mg (0,14 mmol) dihydrosfingosinu a rozpuštěna v 16 ml suchého THF a 8 ml suchého DCM. Suchý diisopropylethylamin (47 μl, 0,27 mmol) byl přidán a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod argonovou atmosférou 30 h. Po odpaření rozpouštědel byl surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií s pomocí CHCl<sub>3</sub>/MeOH 50:1. **Výtěžek:** 93 mg (96 %) **Cer EODs** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 93.5 – 95 °C. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1), *R<sub>f</sub>* = 0.44. **[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>** = -1.96 (c = 1, CHCl<sub>3</sub>). **IR** 3368, 2917, 2851, 1726, 1638, 1557, 1473 cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.37 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 5.47 – 5.25 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 4.06 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>), 4.04 – 4.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>(OH)), 3.87 – 3.81 (m, 1H, CH(NH)), 3.81 – 3.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(OH)-CH(NH)-CH(OH)), 2.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 2.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.23 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.11 – 2.01 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1.70 – 1.57 (m, 8H), 1.58 – 1.50 (m, 4H), 1.44 – 1.17 (m, 90H), 0.94 – 0.84 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.02, 173.57, 130.20, 130.03, 128.02, 127.89, 74.25, 64.43, 62.51, 53.70, 36.88, 34.55, 34.41, 31.93, 31.53, 29.71, 29.68, 29.66, 29.64, 29.59, 29.57, 29.54, 29.52, 29.37, 29.35,

29.31, 29.26, 29.17, 29.13, 29.12, 28.65, 27.19, 25.97, 25.94, 25.78, 25.62, 25.01, 22.69, 22.57, 14.12, 14.07. **Elementární analýza:** C<sub>68</sub>H<sub>131</sub>NO<sub>5</sub>·0.5 H<sub>2</sub>O (1051.81) Vypočteno: C 77.76 H 12.65 N 1.33, nalezeno: C 77.66 H 12.86 N 1.24. **MALDI** [M + H]<sup>+</sup> Vypočteno: 1043.01, nalezeno: 1043.00.

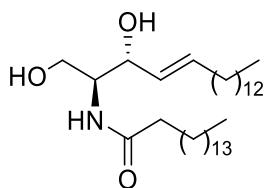
32-(Linoleoyloxy)-*N*-((2*S*,3*R*,6*R*,*E*)-1,3,6-trihydroxyoktadec-4-en-2-yl)dotriakontanamid  
(Cer EOH)



Sloučenina **17** (10 mg, 0,01 mmol) byla smíchána s 4 mg (0,01 mmol) 6-hydroxysfingosinu a rozpuštěna v 3 ml suchého THF a 1,5 ml suchého DCM. Suchý diisopropylethylamin (7 µl, 0,04 mmol) byl přidán a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod argonovou atmosférou 30 h. Po odpaření rozpouštědel byl surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií s pomocí CHCl<sub>3</sub>/MeOH 50:1. **Výtěžek:** 4 mg (33 %) **Cer EOH** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 94 – 96 °C. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1), *R<sub>f</sub>* = 0.33. **[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>** = 38.95 (c = 0.267, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2:1). **IR** 3308, 2917, 2849, 1739, 1622, 1542, 1471. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.28 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH), 5.86 (dd, *J* = 16.0, 5.7 Hz, 1H, CH(OH)-CH=CH-CH(OH)), 5.79 (dd, *J* = 15.6, 5.5 Hz, 1H, CH(OH)-CH=CH-CH(OH)), 5.47 – 5.24 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 4.45 – 4.35 (m, 1H, CH(NH)-CH(OH)), 4.21 – 4.14 (m, 1H, CH=CH-CH(OH)-CH<sub>2</sub>), 4.06 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>), 4.02 – 3.92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(OH)-CH(NH)), 3.77 – 3.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>(OH)), 2.78 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 2.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.24 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CO-CH<sub>2</sub>), 2.09 – 2.02 (m, 4H), 1.78 – 1.48 (m, 8H, překrývá se s vodou), 1.46 – 1.17 (m, 88H), 0.92 – 0.87 (m, 6H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.99, 173.94, 135.58, 130.20, 130.04, 129.50, 128.02, 127.89, 74.16, 72.03, 64.42, 62.32, 54.22, 37.36, 36.82, 34.41, 31.92, 31.52, 29.70, 29.67, 29.65, 29.61, 29.59, 29.53, 29.51, 29.35, 29.30, 29.26, 29.17, 29.13, 28.65, 27.20, 25.94, 25.72, 25.63, 25.42, 25.01, 22.69, 22.57, 14.11, 14.06. **Elementární analýza:** C<sub>68</sub>H<sub>131</sub>NO<sub>7</sub> (1056.78) Vypočteno: C 77.29 H 12.30 N 1.33, nalezeno C 77.20 H 11.98 N 1.16. **MALDI** [M + K]<sup>+</sup> Vypočteno: 1094.94, nalezeno: 1094.94.

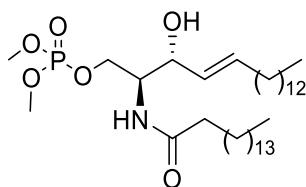
## 7.4. Syntéza ceramid-1-fosfátů a modifikovaného gangliosidu

(E)-N-(1,3-dihydrooktadec-4-en-2-yl)palmitamid (**1**)



130 mg (0,43 mmol) sfingosinu bylo smícháno s 244 mg (0,69 mmol) sukcinimidyl-palmitátu a vysušeno na vakuu. Bylo přidáno 20 ml suchého DCM, 15 ml suchého THF a poté 225  $\mu$ l (1,29 mmol) suchého diisopropylethylaminu a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc pod argonovou atmosférou. Byl přidán  $\text{CHCl}_3$  do vyčeření zakalené reakční směsi a reakční směs byla extrahována vodou (2  $\times$  30 ml). Vodné frakce byly ještě extrahovány  $\text{CHCl}_3$  (3  $\times$  30 ml) a spojené organické frakce byly vysušeny  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařeny. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  30:1. **Výtěžek:** 207 mg (89 %) sloučeniny **1** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 98 – 99 °C. **TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1),  $R_f = 0,47$ . Látka odpovídá literatuře.

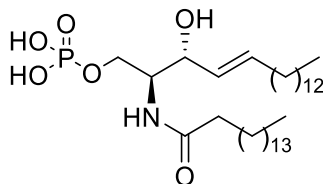
(E)-3-hydroxy-2-palmitooktadec-4-en-1-yl dimethyl fosfát (**2**)



200 mg (0,37 mmol) sloučeniny **1** bylo smícháno s 242 mg (0,74 mmol) 1,2-dobrom-1,1,2,2-tetrachlorethanu a s 48 mg (0,074 mmol) monohdrátu cetylpyridinium bromidu. Bylo přidáno 15 ml DCM a poté 262  $\mu$ l (2,22 mmol) trimethyl fosfitu. Do prudce promíchávaného roztoku bylo pomalu přikapáno 9 ml 2M NaOH. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 1 hodinu. DCM vrstva se zbarvila do oranžova. Bylo přidáno dalších 10 ml DCM a reakční směs byla extrahována vodou (3  $\times$  20 ml). Organická vrstva byla odpařena a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  70:1. **Výtěžek:** 169 mg (70 %) sloučeniny **2** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 57 – 58 °C. **TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1),  $R_f = 0,42$ .  **$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.26 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 5.84 – 5.67 (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 4.41 – 4.27 (m, 1H), 4.22 – 4.06 (m, 3H), 3.91 – 3.67 (m, 6H), 2.20 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.26 (m, 46H), 0.88 (m, 6H).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.73, 134.87, 128.44, 77.24, 77.19, 76.99, 76.74, 72.47, 66.55, 66.50, 54.61, 54.60, 54.56, 54.55, 53.90, 53.86, 36.73, 32.29,

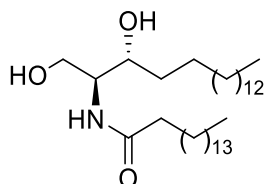
31.90, 29.68, 29.67, 29.65, 29.64, 29.61, 29.50, 29.38, 29.34, 29.32, 29.28, 29.25, 29.12, 25.67, 22.66, 14.09.

(E)-3-hydroxy-2-palmitoooktadec-4-en-1-yl dihydrogen fosfát (**3**)



160 mg (0,25 mmol) sloučeniny **2** bylo vysušeno na vakuu a poté rozpuštěno v 40 ml suchého DCM pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla ochlazena na 0 °C a bylo pomalu přidáno 165  $\mu$ l (1,25 mmol) trimethylsilyl bromidu. Přívod argonu byl odstraněn, reakční směs byla nechána dojít na laboratorní teplotu a byla dále míchána po dobu 5 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl rozsuspendován ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 a míchán při laboratorní teplotě 1 hodinu. Pevná část byla odfiltrována, rozpuštěna v nadbytku CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1 a odpařena se silikagelem. Látka byla čištěna sloupcovou chromatografií, nejprve CHCl<sub>3</sub>/MeOH 30:1 (dokud nebyla izolována veškerá nezreagovaná látka), poté CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 25:15:4:3,5), **Výtěžek:** 84 mg (55 %) sloučeniny **3** jako lehce nahnědlá pevná látka. **Teplota tání** 250 °C, rozklad. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 25:15:4:3,5), *R<sub>f</sub>* = 0,83. **NMR** spektra se nepodařilo naměřit z důvodu nerozpustnosti látky. **MALDI:** vypočteno [M + Na]<sup>+</sup> = 640.47, nalezeno 640.45.

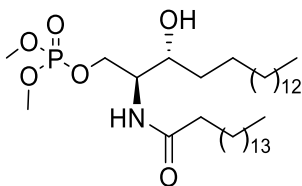
*N*-(1,3-dihydroxyoktadekan-2-yl)palmitamid (**4**)



130 mg (0,43 mmol) dihydrosfingosinu bylo smícháno s 244 mg (0,69 mmol) sukcinimidyl-palmitátu a vysušeno na vakuu. Bylo přidáno 20 ml suchého DCM, 15 ml suchého THF a poté 225  $\mu$ l (1,29 mmol) suchého diisopropylethylaminu a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc pod argonovou atmosférou. Byl přidán CHCl<sub>3</sub> do vyčerení zakalené reakční směsi a reakční směs byla extrahována vodou (2  $\times$  30 ml). Vodné frakce byly ještě extrahovány CHCl<sub>3</sub> (3  $\times$  30 ml) a spojené organické frakce byly vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařeny. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím CHCl<sub>3</sub>/MeOH 30:1. **Výtěžek:** 214 mg (92 %) sloučeniny **4** jako bílá pevná látka. **Teplota tání** 105 – 106,5 °C. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1), *R<sub>f</sub>* = 0,47. Látka odpovídá literatuře.

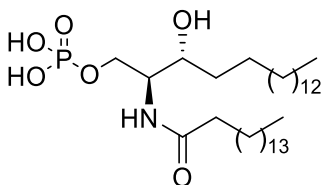


### 3-hydroxy-2-palmitooktadecyl dimethyl fosfát (5)



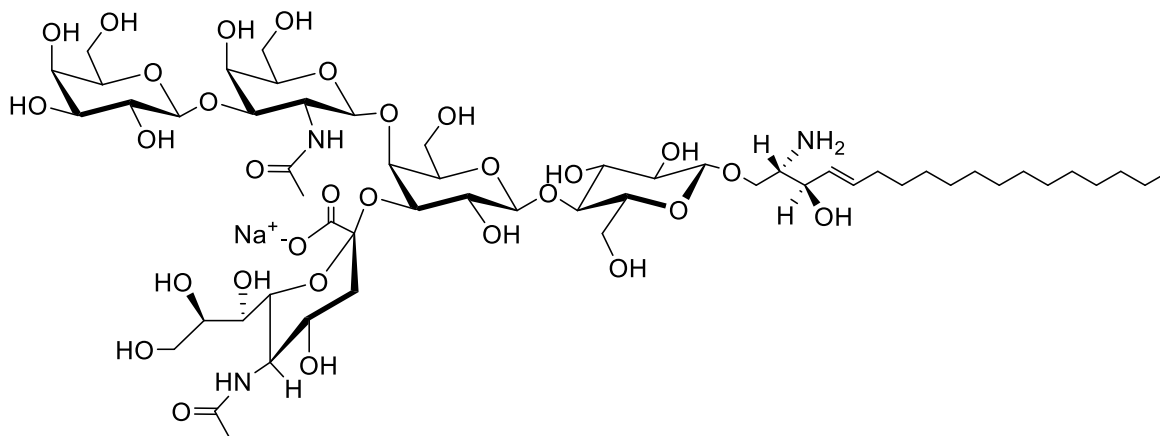
200 mg (0,37 mmol) sloučeniny **4** bylo smícháno s 242 mg (0,74 mmol) 1,2-dobrom-1,1,2,2-tetrachlorethanu a s 48 mg (0,074 mmol) monohdrátu cetylpyridinium bromidu. Bylo přidáno 15 ml DCM a poté 262  $\mu$ l (2,22 mmol) trimethyl fosfitu. Do prudce promíchávaného roztoku bylo pomalu přikapáno 9 ml 2M NaOH. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 1 hodinu. DCM vrstva se zbarvila do oranžova. Bylo přidáno dalších 10 ml DCM a reakční směs byla extrahována vodou (3  $\times$  20 ml). Organická vrstva byla odpařena a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s použitím  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  70:1. **Výtěžek:** 193 mg (81 %) sloučeniny **5** jako bílá pevná látka. Látka nebyla charakterizována a byla využita rovnou do další reakce.

### 3-hydroxy-2-palmitooktadecyl dihydrogen fosfát (6)



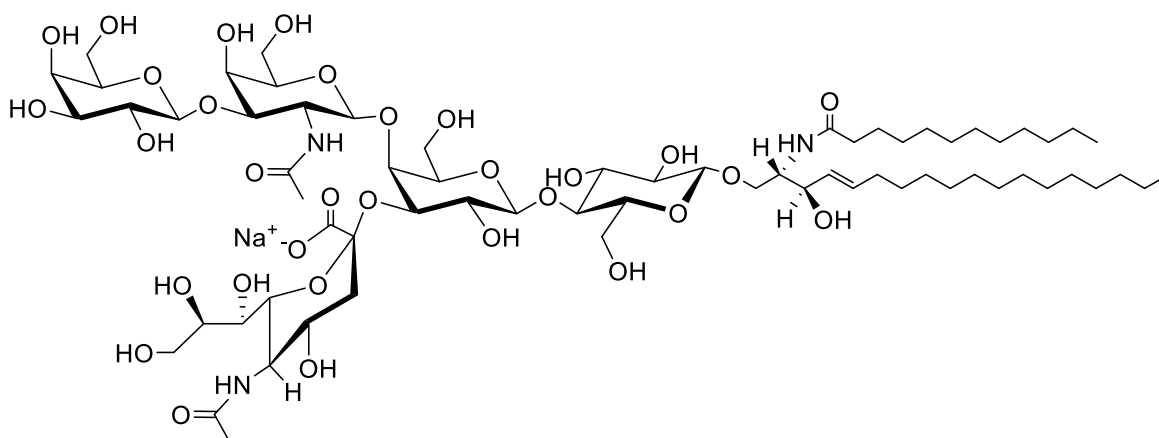
180 mg (0,28 mmol) sloučeniny **5** bylo vysušeno na vakuu a poté rozpuštěno v 45 ml suchého DCM pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla ochlazena na 0 °C a bylo pomalu přidáno 185  $\mu$ l (1,4 mmol) trimethylsilyl bromidu. Přívod argonu byl odstraněn, reakční směs byla nechána dojít na laboratorní teplotu a byla dále míchána po dobu 5 hodin. Rozpuštědlo bylo odpařeno a odparek byl rozsuspendován ve směsi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  1:1 a míchán při laboratorní teplotě 1 hodinu. Pevná část byla odfiltrována, rozpuštěna v nadbytku  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10:1 a odpařena se silikagelem. Látka byla čištěna sloupcovou chromatografií, nejprve  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  30:1 (dokud nebyla izolována veškerá nezreagovaná látka), poté  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$  25:10:3:2. **Výtěžek:** 105 mg (61 %) sloučeniny **6** jako lehce nahnědlá pevná látka. **Teplota tání** 250 °C, rozklad. **TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$  25:15:4:3,5),  $R_f = 0,83$ . **NMR** spektra se nepodařilo naměřit z důvodu nerozpustnosti látky. **MALDI:** vypočteno  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 642.48$ , nalezeno 642.48.

(2S,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3-(((2S,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-(((2R,3S,4R,5R,6R)-6-(((2S,3R,E)-2-amino-3-hydroxyoctadec-4-en-1-yl)oxy)-4,5-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy)-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-4-yl)oxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-karboxylát sodný (**lyso GM1**)



K 5 mg (0,003 mmol) gangliosidu **GM1** v Ependorfce bylo přidáno 1,1 ml octanového pufru o pH 5,8 (s obsahem 220 mg CaCl<sub>2</sub> a 80 mg monohydrátu taurodeoxycholátu sodného v 20 ml pufru) a 210 mU enzymu ceramid deacylázy. Reakční směs byla zahřívána po dobu 3 dnů v termostatu na 37 °C. Postupně se z roztoku vylučuje krystalická vápenatá sůl kyseliny stearové. Suspenze byla odstředěna (12000 otáček po dobu 3 minut) a supernatant byl čištěn chromatograficky přes kolonku pro SPE naplněnou ENVI – 18 reverzní fází. Jako mobilní fáze byla nejprve použita voda, poté 65% MeOH a produkt byl vypláchnut 85% MeOH. **Výtěžek:** 2 mg (48 %) **lyso GM1** jako pevná látka. **TLC** (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/konc. NH<sub>3</sub> 3:2:0,6), R<sub>f</sub> = 0,16. Struktura potvrzena pomocí MS, vypočteno [M - H]<sup>+</sup> = 1278.61, nalezeno 1278.70.

(2S,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3-(((2S,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-5-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-(((2R,3S,4R,5R,6R)-6-(((2S,3R,E)-2-dodekanamido-3-hydroxyoctadec-4-en-1-yl)oxy)-4,5-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy)-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-4-yl)oxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-karboxylát sodný (**C12 GM1**)



2 mg (0,0016 mmol) **lyso GM1** byly smíchány s 0,927 mg (0,0031 mmol) sukcinimidyl-laurátu a dobře vysušeno. Přidáno 250  $\mu$ l suchého DMF a poté 1,36  $\mu$ l (0,008 mmol) DIPEA a reakční směs byla míchána pod argonem při laboratorní teplotě 3 dny. Ukončení reakce detekováno pomocí MS. DMF byl opatrně odpařen a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s použitím nejprve  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3:2, poté  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2,5\text{M NH}_3$  6:4:1 jako mobilní fáze. **Výtěžek:** 1,9 mg (83 %) **C12 GM1** jako pevná látka. **TLC** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{konc. NH}_3$  3:2:0,6),  $R_f = 0,40$ . Struktura potvrzena pomocí MS, vypočteno  $[\text{M} - \text{H}]^+ = 1460,78$ , nalezeno 1460,89.

## 7.5. Příprava modelových membrán SC

Byly připraveny dva rozdílné typy lipidových modelových membrán s obsahem ekvimolární směsi Cer, mastných kyselin a Chol s 5 hmotnostními % přídávkem CholS. Jednoduchý model se skládal z Cer EOS, Cer NS, LA, Chol a CholS. Jako kontrola u jednoduchého modelu byla použita membrána bez Cer EOS. Složení je detailně uvedeno na Obrázku 25.

Komplexní modely byly sestaveny z AcylCer, šestikomponentní směsi Cer (Cer-mix), směsi mastných kyselin (FFA-mix), Chol a CholS ve stejných poměrech, jako je popsáno výše. Složení Cer-mix<sup>108, 141-143</sup> a FFA-mix<sup>164</sup> bylo vybráno tak, aby co nejpřesněji napodobovalo složení lipidů ve SC a je detailněji popsáno na Obrázku 25. Kvůli nedostatku acylCer a Cer založených na 6-hydroxasfingosinu nebyly tyto Cer zahrnuty do modelů; Cer AS a Cer AP byly použity místo Cer NH a Cer AH. V tomto modelu byly studované acylCer založeny na sfingosinu (Cer EOS), fytosfingosinu (Cer EOP), dihydroxfingosinu (Cer EODS) případně jejich směsi (Cer EO-mix). Jako negativní kontrola byla použita membrána bez obsahu acylCer, která obsahovala Cer-mix, FFA-mix, Chol a 5 hmotnostních % CholS (Obrázek 25).

Lipidová směs (1,35 mg) byla rozpuštěna v 400  $\mu$ l hexanu/96% ethanolu 2:1 (v/v) a byla nasprejována na krycí sklíčko (22  $\times$  22 mm) pro práškovou rentgenovou difrakci (XRPD) nebo na Nuclepore polykarbonátový filtr pro permeabilitní experimenty. Roztok lipidů byl nasprejován ve čtyřech dávkách (4  $\times$  100  $\mu$ l) pod proudem dusíku na sklíčko/filtr pomocí Linomatu V (Camag, Muttenz, Švýcarsko), vybaveného přídavným pohybem po ose  $\gamma$ .<sup>192</sup> Rychlost nastříkávání byla 10,2  $\mu$ l/min a nasprejovaná plocha byla 1 cm<sup>2</sup>. Lipidové filmy byly zahřáty na 90 °C po dobu 10 minut a poté pomalu (3 – 4 hodiny) nechány ochladnout na 32 °C. Membrány byly uchovávány při 32 °C a 40 – 50% vlhkosti po dobu nejméně 24 h před experimenty.<sup>137, 154</sup> Jednotné složení lipidů bylo ověřeno pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie.<sup>161</sup>

## 7.6. Prášková rentgenová difrakce (XRPD)

XRPD studovaných lipidových membrán bylo provedeno na přístroji X'Pert PRO  $\theta$ - $\theta$  práškovém difraktometru (PANanalytical B.V., Almelo, Holandsko) s parafokusační Bragg-Bretano geometrií, využívající ozařování ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ,  $U = 40 \text{ kV}$ ,  $I = 30 \text{ mA}$ ) v modifikovaných držácích vzorku s rozsahem úhlů 0,6 – 30° ( $2\theta$ ) a počítacím časem 20,32 s/krok. Data byla vyhodnocována s použitím X'Pert Data Viewer (PANanalytical B.V., Almelo, Holandsko). XRPD difraktogramy ukazují rozptylovou intenzitu jako funkci rozptylového vektoru  $Q$  [ $\text{nm}^{-1}$ ], což je úměrné rozptylovému úhlu  $\theta$  podle rovnice:  $Q = 4\pi \sin\theta/\lambda$  ( $\lambda =$

0,15418 nm je vlnová délka rentgenového záření). Mezirovinná vzdálenost  $d$  [nm] charakterizuje pravidelnou vzdálenost paralelních dvojvrstev uspořádaných na jednodimenzionální mřížku. Toto uspořádání lipidů se nazývá lamelární fáze (L). Difraktogramy lamelárních fází ukazují soubor Braggových reflexí, jejichž reciproční vzdálenosti jsou v charakteristických poměrech  $Q_n = 2\pi n/d$  (číslo reflexe  $n = 1, 2, 3\dots$ ). Mezirovinná vzdálenost  $d$  byla získána ze směrnice  $a$  lineární regresní funkce závislosti  $Q_n = a \times n$ , podle rovnice  $d = 2\pi/a$ .

## 7.7. Permeabilitní experimenty

Pro permeabilitní experimenty byly použity cely Franzova typu s objemem akceptorové části  $6,5 \pm 0,1$  ml (přesný objem byl měřen pro každou celu a byl zahrnut do výpočtu fluxu). Lipidové membrány byly upevněny do teflonových držáků s plochou otvoru  $0,5 \text{ cm}^2$  a s lipidovou membránou na straně donorového kompartmentu. Tyto držáky byly upevněny do Franzových cel. Akceptorová část byla naplněna fosfátovým pufrem s pH 7,4 s 50 mg/l gentamicinu a membrány byly udržovány při  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 12 h. Po 12 h byla změřena ztráta vody přes membránu a elektrická impedance (viz. níže).

Poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  donorové suspenze (5 % TH nebo 2 % IND v 60% propylen glykolu, připraveno podle reference<sup>137, 154</sup>) na membránu. Vzorky z akceptorové fáze (300  $\mu\text{l}$ ) byly odebírány každé 2 h po dobu 10 h a odebrané množství bylo doplněno pufrem.<sup>154</sup> Typické hodnoty lag time byly nižší než 0,5 h, proto 10 h bylo dostačující pro dosažení ustáleného stavu. Ve všech experimentech byly zachovány podmínky pasivní difúze a polykarbonátový filtr neměl žádný vliv na permeabilitu membrán.<sup>137</sup> Navíc 100  $\mu\text{l}$  60% propylen glykolu neextrahovalo žádné lipidy z membrány,<sup>161</sup> což bylo dokázáno pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie.

## 7.8. Ztráta vody přes membrány

Ztráta vody přes membrány byla měřena pomocí přístroje Tewameter® TM 300 probe a Multi Probe Adapter Cutometer® MPA 580 (CK electronic GmbH, Kolín, Německo). Sonda byla položena na teflonový držák (po dočasném odstranění donorové části) s efektivní plochou  $0,5 \text{ cm}^2$  a vzdáleností 0,5 cm od sondy. Měřicí čas byl 80 s a hodnota průměrného ustáleného stavu byla zaznamenána [ $\text{g/h/m}^2$ ]. Měření probíhalo při  $26 - 29 \text{ }^\circ\text{C}$  a 40 – 46% relativní vlhkosti v krabici, která zabraňovala proudění vzduchu v okolí.

## 7.9. Elektrická impedance

Elektrická impedance byla měřena pomocí přístroje LCR meter 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo) při frekvenci střídavého proudu 120 Hz. Rozsah měření tohoto přístroje byl od 20  $\Omega$  do 10 M $\Omega$  a chybou v k $\Omega$  hodnotách, menší než 0,5 %. Pro naše experimenty bylo nanášeno 500  $\mu$ l fosfátového pufru do donorového kompartmentu difúzní cely a impedance [k $\Omega$   $\times$  cm<sup>2</sup>] byla měřena pomocí nerezových sond, vložených do donorového a akceptorového kompartmentu. Na konci měření byl pufr opatrně odstraněn.

## 7.10. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Nasbírané vzorky z permeabilitních experimentů s TH a IND byly analyzovány pomocí izokratické HPLC na reverzní fázi s použitím přístroje Schimadzu Prominence (Schimadzu, Kyoto, Japonsko), sestávajícího z LC-20AD pump s DGU-20A3 odplynovače, SIL-20A HT autosampleru, CTO-20AC vyhřívané komory, SPDM20A detektoru a CBM-20A komunikačního modulu. Data byla analyzována pomocí LCsolutions 1.22 softwaru. Separace TH na reverzní fázi byla provedena na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Německo) při 35 °C, s použitím methanol/0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (v/v) 4:6 jako mobilní fáze při průtoku 1,2 ml/min. Vzorky z akceptorové fáze (20  $\mu$ l) byly vstříkovány na kolonu a byla měřena UV absorpce při 272 nm. Retenční čas TH byl 3,2  $\pm$  0,1 min. Vzorky s obsahem IND byly měřeny na stejné koloně s použitím mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina octová (v/v/v) 90:60:5 při průtokové rychlosti 2 ml/min. 100  $\mu$ l vzorku z akceptorové fáze bylo vstříknuto na kolonu, která byla udržována při 40 °C. UV absorpce byla měřena při vlnové délce 260 nm a retenční čas IND byl 3,1  $\pm$  0,1 min. Obě metody byly dříve validovány.<sup>154, 193</sup>

## 7.11. Vyhodnocení dat

Kumulativní množství TH a IND, které prošly přes membránu, byly počítány z koncentrací, naměřených HPLC a z objemu Franzovy difúzní cely a byly opraveny o doplněnou akceptorovou fázi. Kumulativní množství byly vyneseny proti času a ustálený flux TH nebo IND [ $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h] byl počítán ze směrnice lineární regresní funkce, získané lineární regresí lineární části permeačního profilu (tj. v ustáleném stavu) v Excelu. Data ze ztráty vody přes membránu byla normalizována vydělením naměřené hodnoty ztráty vody [g/h/m<sup>2</sup>] průměrnou ztrátou vody přes kontrolní membránu [g/h/m<sup>2</sup>], vynásobeno 100 %. Hodnoty elektrické impedance byly normalizovány ke kontrole stejným způsobem. Všechna data jsou

prezentována jako průměry  $\pm$  SEM. One-way ANOVA s Dunettovým posttestem nebo t-test, jak je popsáno na jednotlivých obrázcích, byly použity pro statistickou analýzu a  $p < 0,05$  bylo považováno za signifikantní.

## 8. Seznam zkratek

AcylCer	acylceramid
AD	atopická dermatitida
Cer	ceramid
Cer-1-P	ceramid-1-fosfát
CerS	ceramid syntáza
CoA	koenzym A
DCM	dichlormethan
DHA	dokosahexaenová kyselina
DIPEA	diisopropylethylamin
DMAP	dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EEDQ	<i>N</i> -ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
ELOVL	elongáza
EtOAc	ethyl-acetát
FLG	filaggrin
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysoce účinná tenkovrstvá chromatografie
Chol	cholesterol
CholS	cholesteryl-sulfát
IND	indometacin
LA	lignocerová kyselina
LDA	diisopropylamid lithný
LI	lamelární ichtyóza



LiHMDS	hexamethyldisilazan lithný
LPP	dlouhá periodická fáze
NaHMDS	hexamethyldisilazan sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PPAR	receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluensulfonát
<i>R<sub>f</sub></i>	retenční faktor
SC	<i>stratum corneum</i>
SPP	krátká periodická fáze
TBDMSCl	<i>tert</i> -butyldimethylsilylchlorid
TEA	triethylamin
TEWL	ztráta vody přes kůži
TH	theofylin
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran
TsOH	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
WSC	ve vodě rozpustný karbodiimid ( <i>N</i> -(3-dimethylamino)propyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid)
XRPD	prášková rentgenová difrakce

## 9. Seznam použité literatury

1. Hannun, Y. A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **1996**, 274 (5294), 1855-1859.
2. Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9 (2), 139-150.
3. Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6 (4), 328-340.
4. Elias, P. M.; Goerke, J.; Friend, D. S. Mammalian epidermal barrier layer lipids - composition and influence on structure. *J. Invest. Dermatol.* **1977**, 69 (6), 535-546.
5. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1841 (3), 422-434.
6. Mojumdar, E.; Kariman, Z.; van Kerckhove, L.; Gooris, G.; Bouwstra, J. The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *BBA-Biomembranes* **2014**, 1838 (10), 2473-2483.
7. Neto, D. 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), 184-195.
8. de Jager, M.; Gooris, G.; Ponc, M.; Bouwstra, J. Acylceramide head group architecture affects lipid organization in synthetic ceramide mixtures. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, 123 (5), 911-916.
9. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Vanderspek, J. A.; Bras, W. Structural investigations of human stratum-corneum by small-angle X-ray-scattering. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, 97 (6), 1005-1012.
10. Bouwstra, J.; Gooris, G.; Bras, W.; Downing, D. Lipid organization in pig stratum corneum. *J. Lipid Res.* **1995**, 36 (4), 685-695.
11. Mojumdar, E. H.; Gooris, G. S.; Barlow, D. J.; Lawrence, M. J.; Deme, B.; Bouwstra, J. A. Skin Lipids: Localization of Ceramide and Fatty Acid in the Unit Cell of the Long Periodicity Phase. *Biophys. J.* **2015**, 108 (11), 2670-2679.
12. Kessner, D.; Brezesinski, G.; Funari, S. S.; Dobner, B.; Neubert, R. H. Impact of the long chain  $\omega$ -acylceramides on the stratum corneum lipid nanostructure. Part 1: Thermotropic phase behaviour of CER [EOS] and CER [EOP] studied using X-ray powder diffraction and FT-Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* **2010**, 163 (1), 42-50.
13. 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), 714-718.
14. White, S. H.; Mirejovsky, D.; King, G. I. Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum-corneum - an X-ray-diffraction study. *Biochemistry* **1988**, 27 (10), 3725-3732.
15. Hansen, H. S.; Jensen, B. Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinatate and  $\alpha$ -linolenate. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 834 (3), 357-363.

16. Jennemann, R.; Rabionet, M.; Gorgas, K.; Epstein, S.; Dalpke, A.; Rothermel, U.; Bayerle, A.; van der Hoeven, F.; Imgrund, S.; Kirsch, J. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, ddr494.
17. Vasireddy, V.; Uchida, Y.; Salem, N.; Kim, S. Y.; Mandal, M. N. A.; Reddy, G. B.; Bodepudi, R.; Alderson, N. L.; Brown, J. C.; Hama, H. Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ( $\geq$  C28) and the unique  $\omega$ -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16* (5), 471-482.
18. 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.
19. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1182* (2), 147-151.
20. Paige, D.; Morse-Fisher, N.; Harper, J. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *Brit. J. Dermatol.* **1994**, *131* (1), 23-27.
21. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45* (3), 237-249.
22. Ohno, Y.; Nakamichi, S.; Ohkuni, A.; Kamiyama, N.; Naoe, A.; Tsujimura, H.; Yokose, U.; Sugiura, K.; Ishikawa, J.; Akiyama, M. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *P. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (25), 7707-7712.
23. Takagi, Y.; Nakagawa, H.; Matsuo, N.; Nomura, T.; Takizawa, M.; Imokawa, G. Biosynthesis of acylceramide in murine epidermis: characterization by inhibition of glucosylation and deglycosylation, and by substrate specificity. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *122* (3), 722-729.
24. Mori, K.; Matsuda, H. Synthesis of sphingosine relatives .10. Synthesis of (2S,3R,4E)-1-O-(beta-D-glucopyranosyl)-N-30'-(linoleoyloxy)triacontanoyl-4-icosasphingenine, a new esterified cerebroside isolated from human and pig epidermis. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, (6), 529-535.
25. Muller, 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), 779-784.
26. Tashiro, T.; Mori, K. Synthesis of Sphingolipids with an omega-Esterified Long Acyl Chain, Ceramide Components of the Human Epidermis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2012**, *76* (9), 1715-1720.
27. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J. Lipid Res.* **2005**, *46* (12), 2649-2656.
28. McIntosh, T. J.; Stewart, M. E.; Downing, D. T. X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: Reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry* **1996**, *35* (12), 3649-3653.
29. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E. R.; Weerheim, A. M.; Ijzerman, A. P.; Ponec, M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J. Lipid Res.* **1998**, *39* (1), 186-196.

30. Morad, S. A.; Cabot, M. C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (1), 51-65.
31. Mullen, T. D.; Spassieva, S.; Jenkins, R. W.; Kitatani, K.; Bielawski, J.; Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Selective knockdown of ceramide synthases reveals complex interregulation of sphingolipid metabolism. *J. Lipid Res.* **2011**, *52* (1), 68-77.
32. Hla, T.; Dannenberg, A. J. Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell metabolism* **2012**, *16* (4), 420-434.
33. Michalik, L.; Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **2007**, *1771* (8), 991-998.
34. Schmuth, M.; Jiang, Y. J.; Dubrac, S.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. Thematic review series: skin lipids. Peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors in epidermal biology. *J. Lipid Res.* **2008**, *49* (3), 499-509.
35. Sheu, M. Y.; Fowler, A. J.; Kao, J.; Schmuth, M.; Schoonjans, K.; Auwerx, J.; Fluhr, J. W.; Man, M.-Q.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. Topical Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\alpha$  Activators Reduce Inflammation in Irritant and Allergic Contact Dermatitis Models. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *118* (1), 94-101.
36. Hatano, Y.; Elias, P. M.; Crumrine, D.; Feingold, K. R.; Katagiri, K.; Fujiwara, S. Efficacy of combined peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  ligand and glucocorticoid therapy in a murine model of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2011**, *131* (9), 1845-1852.
37. Mastrofrancesco, A.; Kovacs, D.; Sarra, M.; Bastonini, E.; Cardinali, G.; Aspite, N.; Camera, E.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Monteleone, G. Preclinical studies of a specific PPAR $\gamma$  modulator in the control of skin inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (4), 1001-1011.
38. Jung, K.; Tanaka, A.; Fujita, H.; Matsuda, A.; Oida, K.; Karasawa, K.; Okamoto, N.; Ohmori, K.; Jee, Y.; Shin, T. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J. Allergy Clin. Immun.* **2011**, *127* (2), 420-429. e6.
39. Uchida, Y.; Holleran, W. M. Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J. Dermatol. Sci.* **2008**, *51* (2), 77-87.
40. Feingold, K. R.; Elias, P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841* (3), 280-94.
41. Radomír, Č. *Anatomie 3. 1 ed.*; Grada: Praha, 1997.
42. van Smeden, J.; Boiten, W. A.; Hankemeier, T.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Vreeken, R. J. Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **2014**, *1841* (1), 70-79.
43. Norlén, L.; Nicander, I.; Lundsjö, 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), 508-516.
44. Mojumdar, E. H.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization. *Soft matter* **2015**, *11* (21), 4326-4336.
45. Long, S.; Wertz, P.; Strauss, J.; Downing, D. Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* **1985**, *277* (4), 284-287.

46. Madison, K. C. Barrier function of the skin: "La Raison d'Etre" of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *121* (2), 231-241.
47. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Gröne, 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), 3312-3321.
48. 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), 2060-2068.
49. Opálka, L. s.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Roh, J.; Kuneš, J. i.; Lenčo, J.; Vávrová, K. i. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org. Lett.* **2015**, *17* (21), 5456-5459.
50. Hanada, K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **2003**, *1632* (1), 16-30.
51. Beeler, T.; Bacikova, D.; Gable, K.; Hopkins, L.; Johnson, C.; Slife, H.; Dunn, T. The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive *csg2Δ* mutant. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (46), 30688-30694.
52. Cuvillier, O. Sphingosine in apoptosis signaling. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **2002**, *1585* (2), 153-162.
53. Pewzner-Jung, Y.; Ben-Dor, S.; Futerman, A. H. When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (35), 25001-25005.
54. Venkataraman, K.; Riebeling, C.; Bodennec, J.; Riezman, H.; Allegood, J. C.; Sullards, M. C.; Merrill, A. H.; Futerman, A. H. Upstream of growth and differentiation factor 1 (*uog1*), a mammalian homolog of the yeast Longevity Assurance Gene 1 (*LAG1*), regulates N-Stearyl-sphinganine (C18-(Dihydro) ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (38), 35642-35649.
55. Geeraert, L.; Mannaerts, G. P.; Paul, P. Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem. J.* **1997**, *327* (1), 125-132.
56. Michel, C.; van Echten-Deckert, G.; Rother, J.; Sandhoff, K.; Wang, E.; Merrill, A. H. Characterization of ceramide synthesis a dihydroceramide desaturase introduces the 4, 5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (36), 22432-22437.
57. Savile, C. K.; Fabrias, G.; Buist, P. H. Dihydroceramide  $\Delta^4$  desaturase initiates substrate oxidation at C-4. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (19), 4382-4385.
58. Gault, C. R.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. In *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*; Springer, 2010, pp 1-23.
59. Alderson, N. L.; Rembiesa, B. M.; Walla, M. D.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Hama, H. The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (47), 48562-48568.
60. Hamanaka, S.; Hara, M.; Nishio, H.; Otsuka, F.; Suzuki, A.; Uchida, Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119* (2), 416-423.

61. Li, W.; Sandhoff, R.; Kono, M.; Zerfas, P.; Hoffmann, V.; Ding, B.; Proia, R. L.; Deng, C.-X. Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3* (2), 120-128.
62. Behne, M.; Uchida, Y.; Seki, T.; de Montellano, P. O.; Elias, P. M.; Holleran, W. M. Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114* (1), 185-192.
63. 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), 1944-1952.
64. 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), 14917-14921.
65. Truett 3rd, A.; King Jr, L. Sphingomyelinase D: a pathogenic agent produced by bacteria and arthropods. *Adv. Lipid Res.* **1992**, *26*, 275-291.
66. Binford, G. J.; Wells, M. A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haploglyne spiders. *Comp. Biochem. Phys. B* **2003**, *135* (1), 25-33.
67. Sugiura, M.; Kono, K.; Liu, H.; Shimizugawa, T.; Minekura, H.; Spiegel, S.; Kohama, T. Ceramide kinase, a novel lipid kinase molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (26), 23294-23300.
68. Wijesinghe, D. S.; Massiello, A.; Subramanian, P.; Szulc, Z.; Bielawska, A.; Chalfant, C. E. Substrate specificity of human ceramide kinase. *J. Lipid Res.* **2005**, *46* (12), 2706-2716.
69. Pettus, B. J.; Bielawska, A.; Spiegel, S.; Roddy, P.; Hannun, Y. A.; Chalfant, C. E. Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (40), 38206-38213.
70. 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), 11320-11326.
71. Gangoiti, P.; Granada, M. H.; Arana, L.; Ouro, A.; Gomez-Muñoz, A. Activation of protein kinase C- $\alpha$  is essential for stimulation of cell proliferation by ceramide 1-phosphate. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (3), 517-524.
72. 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), 500-510.
73. Ouro, A.; Arana, L.; Gangoiti, P.; Rivera, I.-G.; Ordoñez, M.; Trueba, M.; Lankalapalli, R. S.; Bittman, R.; Gomez-Muñoz, A. Ceramide 1-phosphate stimulates glucose uptake in macrophages. *Cell. Signal.* **2013**, *25* (4), 786-795.
74. Gómez-Muñoz, A.; Kong, J. Y.; Salh, B.; Steinbrecher, U. P. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J. Lipid Res.* **2004**, *45* (1), 99-105.
75. Kolter, T.; Proia, R. L.; Sandhoff, K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (29), 25859-25862.

76. Maccioni, H. J.; Daniotti, J. L.; Martina, J. A. Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **1999**, *1437* (2), 101-118.
77. Kolter, T.; Sandhoff, K. Sphingolipids—Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angew. Chem. Int. Ed* **1999**, *38*, 1532-1568.
78. Lannert, H.; Bünning, G.; Jeckel, D.; Wieland, F. T. Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* **1994**, *342* (1), 91-96.
79. 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), 1959-1965.
80. Mutoh, T.; Tokuda, A.; Miyadai, T.; Hamaguchi, M.; Fujiki, N. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *P. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92* (11), 5087-5091.
81. Nojiri, H.; Stroud, M.; Hakomori, S.-i. A specific type of ganglioside as a modulator of insulin-dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (7), 4531-4537.
82. Breathnach, A. S. Aspects of epidermal ultrastructure. *J. Invest. Dermatol.* **1975**, *65* (1), 2-15.
83. Grayson, S.; Elias, P. M. Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum membrane complexes: implications for the cutaneous permeability barrier. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78* (2), 128-135.
84. Hou, S. Y. E.; 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), 215-223.
85. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E. R.; Ponc, M. Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *J. Lipid Res.* **2001**, *42* (11), 1759-1770.
86. 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), 611-614.
87. Bommannan, D.; Potts, R. O.; Guy, R. H. Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy. *J. Invest. Dermatol.* **1990**, *95* (4), 403-408.
88. Pilgram, G. S.; Engelsma-van Pelt, A. M.; Koerten, H. K.; Bouwstra, J. A. Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J. Invest. Dermatol.* **1999**, *113* (3), 403-409.
89. Bouwstra, J.; Gooris, G.; Salomons-de Vries, M.; Van der Spek, J.; Bras, W. Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: a wide-angle X-ray diffraction study. *Int. J. Pharm.* **1992**, *84* (3), 205-216.
90. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **2014**, *1841* (3), 295-313.

91. Elias, P. M.; Fartasch, M.; Crumrine, D.; Behne, M.; Uchida, Y.; Holleran, W. M. Origin of the corneocyte lipid envelope (CLE): Observations in Harlequin ichthyosis and cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115* (4), 765-769.
92. Akiyama, M.; Sugiyama-Nakagiri, Y.; Sakai, K.; McMillan, J. R.; Goto, M.; Arita, K.; Tsuji-Abe, Y.; Tabata, N.; Matsuoka, K.; Sasaki, R. Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115* (7), 1777-1784.
93. Leung, D. Y. M.; Bieber, T. Atopic dermatitis. *Lancet* **2003**, *361* (9352), 151-160.
94. Mozaffari, H.; Pourpak, Z.; Pourseyed, S.; Farhoodi, A.; Aghamohammadi, A.; Movahadi, M.; Gharaghozloo, M.; Moin, M. Quality of life in atopic dermatitis patients. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2007**, *40* (3), 260-264.
95. Alanne, S.; Nermes, M.; Söderlund, R.; Laitinen, K. Quality of life in infants with atopic dermatitis and healthy infants: a follow-up from birth to 24 months. *Acta Paediatr.* **2011**, *100* (8), e65-e70.
96. Slattery, M. J.; Essex, M. J.; Paletz, E. M.; Vanness, E. R.; Infante, M.; Rogers, G. M.; Gern, J. E. Depression, anxiety, and dermatologic quality of life in adolescents with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128* (3), 668.
97. Van Valburg, R. W.; Willemsen, M. G.; Dirven-Meijer, P. C.; Oranje, A. P.; Van Der Wouden, J. C.; Moed, H. Quality of life measurement and its relationship to disease severity in children with atopic dermatitis in general practice. *Acta Derm. Venereol.* **2011**, *91* (2), 147-151.
98. Yoshiike, T.; Aikawa, Y.; Sindhvananda, J.; Suto, H.; Nishimura, K.; Kawamoto, T.; Ogawa, H. Skin barrier defect in atopic dermatitis: increased permeability of the stratum corneum using dimethyl sulfoxide and theophylline. *J. Dermatol. Sci.* **1993**, *5* (2), 92-96.
99. Elias, P. M.; Steinhoff, M. "Outside-to-inside"(and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2008**, *128* (5), 1067-1070.
100. Palmer, C. N.; Irvine, A. D.; Terron-Kwiatkowski, A.; Zhao, Y.; Liao, H.; Lee, S. P.; Goudie, D. R.; Sandilands, A.; Campbell, L. E.; Smith, F. J. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* **2006**, *38* (4), 441-446.
101. O'Regan, G. M.; Irvine, A. D. The role of filaggrin loss-of-function mutations in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *8* (5), 406-410.
102. Oyoshi, M. K.; He, R.; Kumar, L.; Yoon, J.; Geha, R. S. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. *Adv. Immunol.* **2009**, *102*, 135-226.
103. Spergel, J. M. From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2010**, *105* (2), 99-106.
104. 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), 523-526.
105. Janssens, M.; Smeden, J.; Puppels, G.; Lavrijsen, A.; Caspers, P.; Bouwstra, J. Lipid to protein ratio plays an important role in the skin barrier function in patients with atopic eczema. *Brit. J. Dermatol.* **2014**, *170* (6), 1248-1255.
106. 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* (6), 894-900.
107. Yamamoto, A.; Serizawa, S.; Ito, M.; Sato, Y. Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* **1991**, *283* (4), 219-223.
108. Ishikawa, J.; Narita, H.; Kondo, N.; Hotta, M.; Takagi, Y.; Masukawa, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Koyano, S.; Yamazaki, S.; Hatamochi, A. Changes in the Ceramide Profile of Atopic Dermatitis Patients. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (10), 2511-2514.
109. Macheleidt, O.; Kaiser, H. W.; Sandhoff, K. Deficiency of epidermal protein-bound &ohgr;-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119* (1), 166-173.
110. van Smeden, J.; Janssens, M.; Kaye, E. C. J.; Caspers, P. J.; Lavrijsen, A. P.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A. The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp. Dermatol.* **2014**, *23* (1), 45-52.
111. Schreiner, V.; Pfeiffer, S.; Lanzendörfer, G.; Wenck, H.; Diembeck, W.; Gooris, G. S.; 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), 654-660.
112. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R. 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), 2755-2766.
113. Zhang, X.-J.; Huang, W.; Yang, S.; Sun, L.-D.; Zhang, F.-Y.; Zhu, Q.-X.; Zhang, F.-R.; Zhang, C.; Du, W.-H.; Pu, X.-M. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat. Genet.* **2009**, *41* (2), 205-210.
114. Jordan, C. T.; Cao, L.; Roberson, E. D.; Duan, S.; Helms, C. A.; Nair, R. P.; Duffin, K. C.; Stuart, P. E.; Goldgar, D.; Hayashi, G. Rare and common variants in CARD14, encoding an epidermal regulator of NF-kappaB, in psoriasis. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *90* (5), 796-808.
115. Tsoi, L. C.; Spain, S. L.; Knight, J.; Ellinghaus, E.; Stuart, P. E.; Capon, F.; Ding, J.; Li, Y.; Tejasvi, T.; Gudjonsson, J. E. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat. Genet.* **2012**, *44* (12), 1341-1348.
116. Fartasch, M. Epidermal barrier in disorders of the skin. *Microsc. Res. Techniq.* **1997**, *38* (4), 361-372.
117. Ghadially, R.; Williams, M. L.; Hou, S. Y. E.; Elias, P. M. Membrane structural abnormalities in the stratum corneum of the autosomal recessive ichthyoses. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *99* (6), 755-763.
118. Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Weerheim, A.; Boddé, H. E.; Ponc, M. Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *105* (4), 619-624.
119. Pilgram, G. S.; Vissers, D. C.; van der Meulen, H.; Pavel, S.; Lavrijsen, S. P.; Bouwstra, J. A.; Koerten, H. K. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117* (3), 710-717.
120. 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 Advances* **2016**, *v tisku*.

121. 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), 1466-1476.
122. Doering, T.; Holleran, W. M.; Potratz, A.; Vielhaber, G.; Elias, P. M.; Suzuki, K.; Sandhoff, K. Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (16), 11038-11045.
123. Mori, K.; Nishio, H. Synthesis of sphingosine relatives.9. Synthesis of (2S,3R,4E)-1-O(beta-D-glucopyranosyl)-N-24-(linoleoyloxy)tricosanoyl-4-sphingenine - the structure proposed for the esterified cerebroside in the epidermis of guinea-pigs. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, (3), 253-257.
124. Mun, J.; Onorato, A.; Nichols, F. C.; Morton, M. D.; Saleh, A. I.; Welzel, M.; Smith, M. B. Structural confirmation of the dihydrosphinganine and fatty acid constituents of the dental pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (23), 3826-3833.
125. Novotny, J.; Pospechova, K.; Hrabalek, A.; Cap, R.; Vavrova, K. Synthesis of fluorescent C-24-ceramide: Evidence for acyl chain length dependent differences in penetration of exogenous NBD-ceramides into human skin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (24), 6975-6977.
126. Kobayashi, Y.; Okui, H. An efficient synthesis of antibiotic (-)-A26771B. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (2), 612-615.
127. Kang, T.; Song, S. B.; Kim, W.-Y.; Kim, B. G.; Lee, H.-Y. Total Synthesis of (-)-Crinipellin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (29), 10274-10276.
128. Dess, D. B.; Martin, J. C. Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (22), 4155-4156.
129. Uragami, M.; Tokutake, N.; Yan, X.; Regen, S. L. Is the linkage region of sphingolipids responsible for lipid raft formation? *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (21), 5124-5125.
130. Masuda, Y.; Mori, K. Synthesis of sphingosine relatives. Part 27. Synthesis and absolute configuration of 6-hydroxylated new ceramides in human skin, ceramides B, 4, 7 and 8. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, (22), 4789-4800.
131. Pandey, A. K.; Naduthambi, D.; Thomas, K. M.; Zondlo, N. J. Proline editing: a general and practical approach to the synthesis of functionally and structurally diverse peptides. Analysis of steric versus stereoelectronic effects of 4-substituted prolines on conformation within peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (11), 4333-4363.
132. Sunitha, S.; Kanjilal, S.; Reddy, P. S.; Prasad, R. B. N. Liquid-liquid biphasic synthesis of long chain wax esters using the Lewis acidic ionic liquid choline chloride center dot 2ZnCl(2). *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (39), 6962-6965.
133. Dhimitruka, H.; SantaLucia, J. Investigation of the Yamaguchi esterification mechanism. Synthesis of a Lux-S enzyme inhibitor using an improved esterification method. *Org. Lett.* **2006**, *8* (1), 47-50.
134. Masuda, Y.; Mori, K. Synthesis of sphingosine relatives. Part-26: Synthesis of ceramide 1 {(2S, 3R, 4E)-N-30'-(linoleoyloxy)triacontanoyl -4-sphingenine}, a unique constituent of human skin. *J. Indian Chem. Soc.* **2003**, *80* (11), 1081-1083.

135. Szulc, Z. M.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A.; Bielawska, A. Highly efficient and regioselective phosphorylation of sphingolipids by phase-transfer catalysis. *Pol. J. Chem.* **2007**, *81* (11), 1899-1909.
136. Huang, F. T.; Han, Y. B.; Feng, Y.; Yang, G. Y. A facile method for controlling the reaction equilibrium of sphingolipid ceramide N-deacylase for lyso-glycosphingolipid production. *J. Lipid Res.* **2015**, *56* (9), 1836-1842.
137. Školová, B.; Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepíčka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palát, K.; Hrabálek, A. Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir* **2013**, *29* (50), 15624-15633.
138. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Cheng, K.; Weerheim, A.; Bras, W.; Ponec, M. Phase behavior of isolated skin lipids. *J. Lipid Res.* **1996**, *37* (5), 999-1011.
139. Uhríková, D.; Rapp, G.; Balgavý, P. Condensed lamellar phase in ternary DNA-DLPC-cationic gemini surfactant system: a small-angle synchrotron X-ray diffraction study. *Bioelectrochemistry* **2002**, *58* (1), 87-95.
140. 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), 452-456.
141. Masukawa, Y.; Narita, H.; Sato, H.; Naoe, A.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J. Lipid Res.* **2009**, *50* (8), 1708-1719.
142. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Kezic, S.; Lavrijsen, A. P. M.; Bouwstra, J. A. Lamellar Lipid Organization and Ceramide Composition in the Stratum Corneum of Patients with Atopic Eczema. *J. Invest. Dermatol.* **2011**, *131* (10), 2136-2138.
143. 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), 403-411.
144. Craven, B. M. Crystal-structure of cholesterol monohydrate. *Nature* **1976**, *260* (5553), 727-729.
145. Bouwstra, J. A.; Ponec, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *BBA-Biomembranes* **2006**, *1758* (12), 2080-2095.
146. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Investigating the barrier function of skin lipid models with varying compositions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (2), 334-342.
147. 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), 1529-1537.
148. Byun, H.-S.; Erukulla, R. K.; Bittman, R. Synthesis of sphingomyelin and ceramide 1-phosphate from ceramide without protection of the allylic hydroxyl group. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (21), 6495-6498.
149. Kratzer, B.; Schmidt, R. R. Efficient synthesis of sphingosine-1-phosphate, ceramide-1-phosphate, lysosphingomyelin, and sphingomyelin. *Liebigs Ann.* **1995**, *1995* (6), 957-963.

150. Szulc, Z. M.; Hannun, Y. A.; Bielawska, A. A facile regioselective synthesis of sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (41), 7821-7824.
151. Uchida, Y. Ceramide signaling in mammalian epidermis. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **2014**, *1841* (3), 453-462.
152. Gantner, M.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Kolter, T. Partial synthesis of ganglioside and lysoganglioside lipofoms as internal standards for MS quantification. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (12), 2692-2704.
153. van Smeden, J.; Janssens, M.; Boiten, W. A.; van Drongelen, V.; Furio, L.; Vreeken, R. J.; Hovnanian, A.; Bouwstra, J. A. Intercellular skin barrier lipid composition and organization in Netherton syndrome patients. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (5), 1238-1245.
154. 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), 2115-2126.
155. de Jager, M.; Groenink, W.; Guivernau, R. B.; 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. *Pharmaceut. Res.* **2006**, *23* (5), 951-960.
156. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Ponec, M. Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: the role of natural and synthetic ceramide 1. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *118* (4), 606-617.
157. Danso, M. O.; van Drongelen, V.; Mulder, A.; van Esch, J.; Scott, H.; van Smeden, J.; El Ghalbzouri, A.; Bouwstra, J. A. TNF- $\alpha$  and Th2 Cytokines Induce Atopic Dermatitis-Like Features on Epidermal Differentiation Proteins and Stratum Corneum Lipids in Human Skin Equivalent. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (7), 1941-1950.
158. Kiselev, M.; Ermakova, E.; Gruzinov, A. Y.; Zabelin, A. Formation of the long-periodicity phase in model membranes of the outermost layer of skin (Stratum corneum). *Crystallogr. Rep.* **2014**, *59* (1), 112-116.
159. 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), 1104-1114.
160. Mitragotri, S. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Control. Release* **2003**, *86* (1), 69-92.
161. 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. *Under review*.
162. White, E. A.; Orazem, M. E.; Bunge, A. L. A critical analysis of single-frequency LCR databridge impedance measurements of human skin. *Toxicol. in Vitro* **2011**, *25* (4), 774-784.
163. Školová, B.; Hudská, K. r.; Pullmannová, P.; Kováčik, A.; Palát, K.; Roh, J.; Fleddermann, J.; Estrela-Lopis, I.; Vávrová, K. i. Different phase behavior and packing of

- ceramides with long (C16) and very long (C24) acyls in model membranes: infrared spectroscopy using deuterated lipids. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (35), 10460-10470.
164. Oguri, M.; Gooris, G. S.; Bito, K.; Bouwstra, J. A. The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. *BBA-Biomembranes* **2014**, *1838* (7), 1851-1861.
165. Kovacik, A.; Roh, J.; Vavrova, K. The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBiochem* **2014**, *15* (11), 1555-1562.
166. Školová, B.; Jandovská, K. i.; Pullmannová, P.; Tesař, O. e.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. i. 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), 5527-5535.
167. 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* (6), 894-900.
168. Uchida, Y.; Hara, M.; Nishio, H.; Sidransky, E.; Inoue, S.; Otsuka, F.; Suzuki, A.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Hamanaka, S. Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J. Lipid Res.* **2000**, *41* (12), 2071-2082.
169. Elias, P. M. Therapeutic implications of a barrier-based pathogenesis of atopic dermatitis. *Ann. Dermatol.* **2010**, *22* (3), 245-254.
170. Fluhr, J. W.; Man, M.-Q.; Hachem, J.-P.; Crumrine, D.; Mauro, T. M.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. Topical peroxisome proliferator activated receptor activators accelerate postnatal stratum corneum acidification. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129* (2), 365-374.
171. Rivier, M.; Castiel, I.; Safonova, I.; Ailhaud, G.; Michel, S. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  enhances lipid metabolism in a skin equivalent model. *J. Investigat. Dermatol.* **2000**, *114* (4), 681-687.
172. Schmuth, M.; Moosbrugger-Martinz, V.; Blunder, S.; Dubrac, S. Role of PPAR, LXR, and PXR in epidermal homeostasis and inflammation. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **2014**, *1841* (3), 463-473.
173. Demerjian, M.; Choi, E. H.; Man, M. Q.; Chang, S.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis. *Exp. Dermatol.* **2009**, *18* (7), 643-649.
174. Mao-Qiang, M.; Fowler, A. J.; Schmuth, M.; Lau, P.; Chang, S.; Brown, B. E.; Moser, A. H.; Michalik, L.; Desvergne, B.; Wahli, W. Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  activation stimulates keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123* (2), 305-312.
175. Yan, Y.; Furumura, M.; Numata, S.; Teye, K.; Karashima, T.; Ohyama, B.; Tanida, N.; Hashimoto, T. Various peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  agonists differently induce differentiation of cultured human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2015**, *24* (1), 62-65.
176. Chiba, T.; Takeuchi, S.; Esaki, H.; Yamamura, K.; Kurihara, Y.; Moroi, Y.; Furue, M. Topical application of PPAR $\alpha$  (but not  $\beta/\delta$  or  $\gamma$ ) suppresses atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Allergy* **2012**, *67* (7), 936-942.

177. Fukaya, M.; Kimata, H. Topical clofibrate improves symptoms in patients with atopic dermatitis and reduces serum TARC levels: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J. Drugs Dermatol.* **2014**, *13* (3), 259-263.
178. Küchler, S.; Henkes, D.; Eckl, K.-M.; Ackermann, K.; Plendl, J.; Korting, H.-C.; Hennies, H.-C.; Schäfer-Korting, M. Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Altern. Lab. Anim.* **2011**, *39* (5), 471.
179. Mildner, M.; Jin, J.; Eckhart, L.; Kezic, S.; Gruber, F.; Barresi, C.; Stremnitzer, C.; Buchberger, M.; Mlitz, V.; Ballaun, C. Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (9), 2286-2294.
180. Vávrová, K.; Henkes, D.; Strüver, K.; Sochorová, M.; Školová, B.; Witting, M. Y.; Friess, W.; Schreml, S.; Meier, R. J.; Schäfer-Korting, M. Filaggrin deficiency leads to impaired lipid profile and altered acidification pathways in a 3D skin construct. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (3), 746-753.
181. Zhang, C.; Gurevich, I.; Aneskievich, B. J. Organotypic modeling of human keratinocyte response to peroxisome proliferators. *Cells Tissues Organs* **2012**, *196* (5), 431-441.
182. Man, M.-Q.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch. Dermatol.* **1993**, *129* (6), 728-738.
183. Serini, S.; Piccioni, E.; Merendino, N.; Calviello, G. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. *Apoptosis* **2009**, *14* (2), 135-152.
184. Mao-Qiang, M.; Choi, E.-H.; Schmuth, M.; Crumrine, D.; Uchida, Y.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Feingold, K. R. Basis for Improved Permeability Barrier Homeostasis Induced by PPAR and LXR Activators: Liposensors Stimulate Lipid Synthesis, Lamellar Body Secretion, and Post-Secretory Lipid Processing. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126* (2), 386.
185. Chun, J.; Byun, H.-S.; Bittman, R. First asymmetric synthesis of 6-hydroxy-4-sphinganine-containing ceramides. Use of chiral propargylic alcohols to prepare a lipid found in human skin. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (2), 348-354.
186. Yadav, J. S.; Geetha, V.; Raju, A. K.; Gnaneshwar, D.; Chandrasekhar, S. The first total synthesis of the 6-hydroxy-4E-sphingenes. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (14), 2983-2985.
187. Mori, K.; Masuda, Y. Synthesis and stereochemistry of ceramide B, (2S,3R,4E,6R)-N-(30-hydroxytriacontanoyl)-6-hydroxy-4-sphinganine, a new ceramide in human epidermis. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (51), 9197-9200.
188. Chuit, P.; Hausser, J. Sur les acides-alcools polyméthylène-carboniques de 8 à 21 atomes de carbone. *Helv. Chim. Acta* **1929**, *12* (1), 463-492.
189. Fisher, G. L.; Walker, A. V.; Hooper, A. E.; Tighe, T. B.; Bahnck, K. B.; Skriba, H. T.; Reinard, M. D.; Haynie, B. C.; Opila, R. L.; Winograd, N. Bond insertion, complexation, and penetration pathways of vapor-deposited aluminum atoms with HO- and CH<sub>3</sub>O-terminated organic monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (19), 5528-5541.
190. Huang, H. C.; Rehmann, J. K.; Gray, G. R. Total synthesis of naturally occurring mycolic acids. (E)- and (Z)-threo-2-Docosyl-3-hydroxytetracont-21-enoate. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (21), 4018-4023.
191. Heiser, U. Copper-catalysed coupling of undec-10-enylmagnesium bromide with ω-functionalised halogenoalkanes as a key reaction for the synthesis of novel bipolar

phospholipids with different head groups and chain length. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1997**, (6), 809-816.

192. 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), 4168-4175.

193. Novotný, J.; Janůšová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2009**, *22* (1), 22-30.

## 10. Seznam publikovaných prací

### 10.1.1. Publikace jako první autor

- 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*, 5456. (IF 6,364)
- Opálka, L.; Kováčik, A.; Maixner, J. a Vávrová, K.: Omega-O-acylceramides in skin lipid membranes: effects of concentration, sphingoid base and model complexity on microstructure and permeability. (v recenzním řízení)

### 10.1.2. Publikace jako spoluautor

- Wallmeyer, L.; Lehnen, D.; Eger, N.; Sochorova, M.; Opalka, L.; Kovacik, A.; Vavrova, K.; Hedtrich, S.: Stimulation of PPAR alpha normalizes the skin lipid ratio and improves the skin barrier of normal and filaggrin deficient reconstructed skin *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *80*, 102. (IF 3,419)
- 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 Advances*. **2016**, v tisku. (IF 3,289)
- Pichery, M.; Huchenoq, A.; Sandhoff, R.; Roy, M.; Severino-Freire, M.; Zaafouri, S.; Opálka, L.; Soldan, V.; Bertrand-Michel, J.; Lhuillier, E.; Serre, G.; Maruani, A.; Mazereeuw-Hautier, J.; Jonca, N.: PNPLA1 defects in patients with ichthyosis and KO mice unveil PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. (v recenzním řízení)
- Školová, B.; Kováčik, A.; Tesař, O.; Opálka, L.; Vávrová, K.: Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Infrared Spectroscopy Studies. (v recenzním řízení)



## 11. Přílohy

**Příloha 1:** 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*, 5456.

**Příloha 2:** Opálka, L.; Kováčik, A.; Maixner, J. a Vávrová, K.: Omega-O-acylceramides in skin lipid membranes: effects of concentration, sphingoid base and model complexity on microstructure and permeability.

**Příloha 3:** Wallmeyer, L.; Lehnen, D.; Eger, N.; Sochorova, M.; Opalka, L.; Kovacik, A.; Vavrova, K.; Hedtrich, S.: Stimulation of PPAR alpha normalizes the skin lipid ratio and improves the skin barrier of normal and filaggrin deficient reconstructed skin *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *80*, 102.

**Příloha 4:** 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 Advances*. **2016**, v tisku.