

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra organické a bioorganické chemie



Syntéza ceramidov odvođených od
6-hydroxysfingozínu

Diplomová práca

Juraj Kavuljak

Hradec Králové 2022

Vedúci práce: *PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.*

Konzultant: *Mgr. Veronika Ondrejčková,*

Pod'akovanie

V tejto časti by som sa chcel poďakovať svojmu školiteľovi *PharmDr.* Lukášovi Opálkovi, *Ph.D.* za vedenie mojej práce, odbornú pomoc, cenné rady, trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval. Ďalej by som sa chcel poďakovať *Mgr.* Veronike Ondrejčekovej za odbornú pomoc a čas, ktorý mi venovala v priebehu vypracovania mojej práce. Poďakovanie ide *prof.* Kateřine Vávrovej, *Ph.D.* za odbornú pomoc a možnosť pracovať pod jej vedením a celej výskumnej skupine *Skin Barrier Research Group*. Taktiež by som sa chcel poďakovať mojej rodine a priateľom, ktorých podpora mi dodala silu vypracovať túto prácu.

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne . Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname literatúry a v práci náležite citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 2022

Juraj Kavuljak

Abstrakt

Názov Diplomovej práce: *Syntéza ceramidov odvodených od 6-hydroxysfingozínu*

Kandidát: *Juraj Kavuljak*

Školiteľ: *PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.*

Konzultant: *Mgr. Veronika Ondrejčeková*

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Skin Barrier Research Group, Katedra organickej a bioorganickej chémie

Ceramidy (Cer) patria do skupiny sfingolipidov, ktoré sa prirodzene nachádzajú vo všetkých ľudských bunkách, kde hrajú dôležitú úlohu v bunkovej signalizácii. Vo vysokých koncentráciách sa Cer nachádzajú v najvrchnejšej vrstve epidermis (stratum corneum). Cer tvoria medzibunkovú multilamelárnu lipidovú maticu spolu s voľnými masnými kyselinami a cholesterolom. Hlavnou funkciou stratum corneum je chrániť telo pred nadmernou transepidermálnou stratou vody, zabezpečiť vnútornú homeostázu a vytvoriť ochrannú bariéru proti škodlivým látkam z vonkajšieho prostredia.

Cer sú amidy dlhých aminoalkoholov (známych ako sfingoidná báza) s vyššou masnou kyselinou naviazanou na ich primárnu aminoskupinu. 6-Hydroxysfingozín (H) je špecifický pre ľudskú epidermis, ale jeho funkcia a biosyntéza v koži stále nie je úplne objasnená. Niektoré štúdie preukázali nižšie koncentrácie Cer na báze H v koži pacientov s atopickou dermatitídou.

Cieľom tohto projektu bolo optimalizovať jednotlivé kroky celkovej syntézy H a od neho odvodených Cer tak, aby boli dosiahnuté vyššie výťažky a umožnila sa syntéza vo vyššom rozsahu.

Retrosyntetická analýza Cer odvodených od H zobrazená na schéme 1 poskytuje v prvom kroku samotný H a odpovedajúcu masnú kyselinu. Vzhľadom k špecifickej stereochemii polárnej hlavičky sfingoidných báz je biosynteticky tato časť do molekuly vnesená pomocou *L*-serinu. Synteticky je možné tento fragment nájsť v takzvanom Garnerovom aldehyde (*(S)*-GA), ktorý môže reagovať s vhodným nukleofilom.

Syntéza H bola teda založená na alkynylácii (*S*)-GA chráneným (*R*)-pendadec-1-yn-3-olom s následnou chromatografickou separáciou jednotlivých vzniknutých diastereomerov. Ďalším kľúčovým krokom bola selektívna redukcia trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu (čo bol jeden z čiastočných cieľov tejto práce) a deproteckia poskytla konečný 6-hydroxysfingozín.

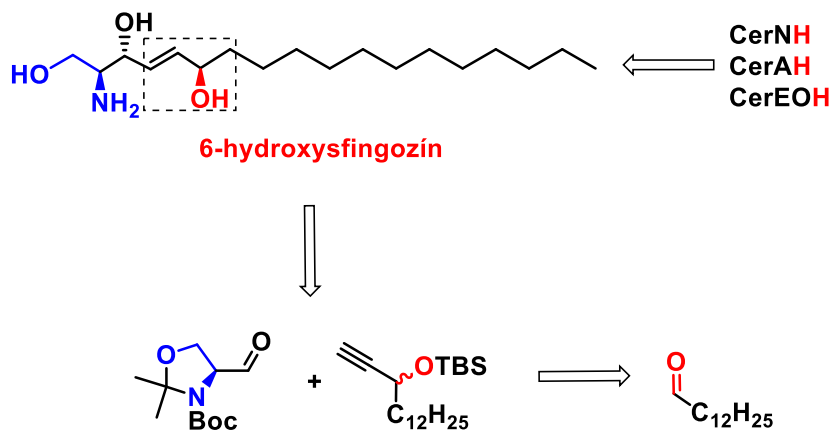


Schéma 1 Retrosyntetický rozbor fyziologického 6-hydroxysfingozínu a od neho odvodených Cer.

Fyziologický H bol pripravený v 7 krokoch (optimalizácia reakčných podmienok 5 z nich bolo náplňou tejto práce) s celkovým výťažkom 21 %. Sfingoidná báza vzniknutá týmto spôsobom v ďalšej časti slúžila na prípravu Cer NH, Cer AH, Cer EOH.

Abstract

Title of the Master thesis: *Synthesis of ceramides derived from 6-hydroxysphingosine*

Candidate: Juraj Kavuljak

Supervisor: *PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.*

Consultant: *Mgr. Veronika Ondrejčková*

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Skin Barrier Research Group, Department of Organic and Bioorganic Chemistry

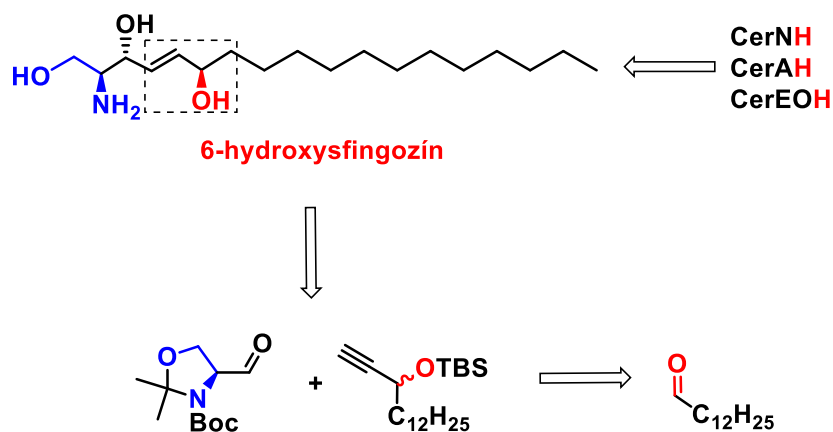
Ceramides (Cer), belong to the group of sphingolipids naturally found in each cell. One of their principal functions is cell signaling. We can find Cer in the uppermost layer of epidermis (stratum corneum), where the concentrations of these lipids are highest in the whole human body. Cer form an intercellular multi-lamellar lipid matrix. This lipid mass is composed of cholesterol and free fatty acids as well. The major function of stratum corneum is to protect the body from the excessive transepidermal water loss, provide internal homeostasis and create a protective barrier against harmful substances from external environment.

Cer are amides of long aminoalcohols with a fatty acid attached to their primary amino group. 6-hydroxysphingosine (H) is specific for human epidermis, but its function and biosynthesis in skin is still not completely understood. Some studies showed lower concentrations of 6-hydroxysphingosine-based Cer in skin of patients suffering from atopic dermatitis.

The aim of this project was to optimize individual steps of H total synthesis to reach higher yields and to enable the synthesis in higher scale.

The retrosynthetic analysis of H-derived Cer shown in Scheme 1 provides H and the corresponding fatty acid in the first step. Due to the specific stereochemistry of the polar head of sphingoid bases, this part is biosynthetically introduced into the molecule by *L*-serine. Synthetically, this fragment can be found in the so-called Garner aldehyde ((*S*)-GA), which can react with a suitable nucleophile.

The synthesis of H was therefore based on the alkylation of (S)-GA with protected (R)-pentadec-1-yn-3-ol followed by chromatographic separation of the individual diastereomers formed. The next key step was the selective reduction of the triple bond to a *trans*-double bond (which was one of the partial goals of this work) and deprotection gave the final 6-hydroxysphingosine.



Scheme 1 Retrosynthesis of physiological 6-hydroxysphingosine and H-Cer.

Physiological H was prepared in 7 steps, 5 of which were the content of this work with a total yield of 21%. The sphingoid base formed in this way was used for the preparation of CerNH, CerAH, CerEOH in the next step of this project.

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt | 4 |
| Abstract | 6 |
| 1. Úvod a cieľ práce | 9 |
| 2. Teoretická časť | 10 |
| 2.1. Koža | 10 |
| 2.2. Stavba kože | 11 |
| 2.3. Stratum corneum | 14 |
| 2.3.1. Stavba SC | 14 |
| 2.3.2. Lipidy v SC | 15 |
| 2.4. Ceramidy | 16 |
| 2.4.1. Štruktúra | 17 |
| 2.4.2. Nomenklatúra | 18 |
| 2.4.3. De novo Biosyntéza Ceramidov | 19 |
| 2.4.4. Rola Ceramidov pri vzniku kožnej bariéry | 20 |
| 2.5. H-ceramidy | 20 |
| 2.5.1. H-Ceramidy z bioorganického hľadiska | 21 |
| 2.5.2. Prehľad Syntéz 6-hydroxyceramidov | 21 |
| 2.5.2.1. Možnosti redukcie trojitej väzby na <i>trans</i> -dvojitú väzbu | 23 |
| 2.6. Abnormality 6-hydroxyceramidov pri kožných ochoreniach | 25 |
| 3. Výsledky a diskusia | 26 |
| 3.1. Schéma syntézy | 26 |
| 3.2. Syntéza 6-hydroxysfingozínu | 27 |
| 3.3. Syntéza 6-hydroxyceramidov | 33 |
| 3.4. Príprava (<i>R</i>)-Cerebrónovej kyseliny | 34 |
| 4. Experimentálna časť | 36 |
| 4.1. Technické parametre a chemikálie | 36 |
| 4.2. Postup prípravy | 36 |
| 4.3. Charakterizácia látok | 43 |
| 5. Záver | 47 |
| 6. Zoznam skratiek | 49 |
| 7. Použitá literatúra | 51 |

1. Úvod a cieľ práce

Ceramidy (Cer) sa radia do obsiahlej skupiny látok známych ako sfingolipidy (SL). Keďže význam a funkcia SL v organizme je rozsiahla, ich štúdium je predmetom výskumu dodnes. Z štúdií publikovaných k dnešnému dňu môžeme o SL tvrdiť, že sa nachádzajú vo všetkých eukaryotických bunkách a hrajú nenahraditeľnú rolu v bunkovej signalizácii a udržaní homeostázy organizmu a svoju funkciu plnia extracelulárne [1], a v neposlednom rade taktiež v rámci bunkových membrán [2, 3].

Cer svojim obsahom predstavujú najpočetnejšiu podskupinu SL. Prítomnosť Cer bola popísaná v rôznych tkanivách ľudského tela. Koža predstavuje miesto s najväčším zastúpením týchto SL, kde spoločne s voľnými masťnými kyselinami (FFA, z anglického free fatty acids), cholesterolom (Chol) a cholesterol-Sulfátom (CholS) tvoria intercelulárny lipidový matrix. Táto intercelulárna štruktúra predstavuje permeabilnú bariéru kože [4].

Z chemického hľadiska sa jedná o amidy dlhých aminoalkoholov, tzv. sfingoidné báze, v ktorých je primárna amínová skupina acylovaná vyššou masťnou kyselinou s variabilnou dĺžkou reťazca. Medzi najčastejšie sfingoidné bázy zastúpené v ľudskom tele radíme sfingozín (S), dihydrosfingozín (dS), fytosfingozín (P) a 6-hydroxysfingozín (H), ktorý sa nachádza výlučne len v ľudskej epidermis. 6-hydroxyceramidy alebo taktiež H-ceramidy (H-Cer) predstavujú skupinu odvodenú od H. Dnes poznáme viac, ako 12 rodín Cer s rozmanitými štruktúrami a funkciami [5].

Zaujímavosťou H-Cer je fakt, že patria medzi pomerne novú skupinu látok lokalizovaných len v epidermis niektorých cicavcov a ich funkcia a biosyntéza doteraz nebola spoľahlivo objasnená. Predpokladá sa, že hrajú dôležitú rolu v rámci kožných ochorení, keďže ich znížená hodnota bola nameraná v koži postihnutej atopickou dermatitídou [6] a psoriázou [7, 8]. Do budúca predstavujú H-Cer potenciálnu možnosť terapie a diagnostiky týchto ochorení.

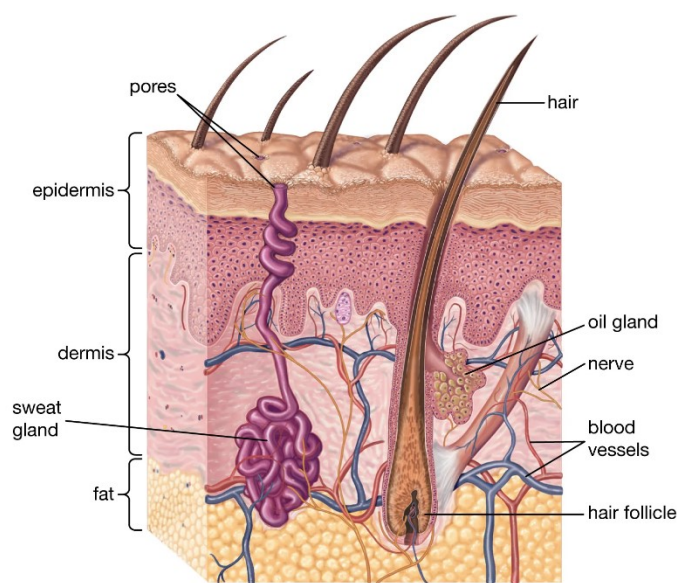
Hlavným problémom štúdie H-Cer je ich komerčná nedostupnosť a skutočnosť, že syntéza týchto látok je náročná a zdĺhavá. Optimalizáciou tejto syntézy sa už zaoberali aj iné práce v rámci našej pracovnej skupiny, avšak boli zamerané na iné aspekty tejto syntézy [9, 10]. Hlavným cieľom tejto práce bola optimalizácia kľúčových krokov navrhutej syntézy H, ktorý predstavuje východiskovú látku prípravy všetkých známych H-Cer. Následne, bolo čiastočným cieľom zamerať sa na možnosti prevedenia syntézy H vo väčšom množstve (niekoľkogramové navážky), aby bolo možné pripraviť dostatok materiálu pre budúce experimenty v rámci jednej prípravy, optimalizácia separácie diastereomérov vzniknutých alkynyláciou Garnerovho aldehydu a preskúmanie rôznych možností redukcie vzniknutej trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu, čo bol krok, ktorý stále komplikoval celú popísanú syntézu. Takto pripravené H-Cer budú následne slúžiť pre štúdium biofyzikálnych vlastností budúcich projektov v rámci výskumnej skupiny pre lepšie pochopenie vzťahu štruktúry a funkcie týchto látok.

2. Teoretická časť

2.1. Koža

Koža (lat. cutis, gr. derma) je najväčším orgánom ľudského tela predstavujúci vonkajšiu bariéru. Jej hmotnosť tvorí 15-20% (obsahuje cca 72 % vody) celkovej hmotnosti ľudského tela a v dospelosti zaujíma plochu 1,5-2 m². Hrúbka kože 0,5-4 mm sa mení v závislosti na jej lokalizácii, funkcii a stavbe. Najsilnejšia koža sa nachádza na chrbte (4 mm spoločne s dermis), zatiaľ čo najtenšia vrstva sa nachádza na očných viečkach (0,5 mm). Ideálne pH kože 5,6-6,4 zaisťuje správnu funkciu kožných enzýmov, obnovu kožného epitelu pri mechanickom poškodení a chráni telo pred pôsobením mikroorganizmov [11-13].

Hlavnou funkciou kože je **ochranná funkcia**, keďže tvorí bariéru proti vonkajším fyzikálnym, chemickým a biologickým vplyvom. Medzi ďalšie funkcie kože patrí **metabolická** (vznik vit. D z prekursoru pôsobením UV žiarenia), **termoregulačná** (hospodárenie s vodou, zmena prietoku krvi tkanivom a izolačné zložky, ako napríklad tuková vrstva a vlasy), **exkretčná** (tvorba potu v mazových žľazách), **resorpčná** (dobrá vstrebateľnosť lipofilných látok), **senzitivna** (prostredníctvom rôznych typov senzitivných nervových zakončení a mechanoreceptorov) a taktiež aj funkcia **sociálnej komunikácie** (prejavenie emócií prostredníctvom ovládania mimických svalov) [13-15]. Na obrázku 1 môžeme vidieť schematický prierez ľudskej kože.



© Encyclopædia Britannica, Inc.

Obrázok 1 Stavba ľudskej kože. V nákrese môžeme vidieť dve základné vrstvy kože teda epidermis a dermis, ktorých výstelku predstavuje tela subcutanea. Prevzaté z britannica.com/science/human-skin.

2.2. Stavba kože

Z histologického hľadiska sa koža skladá z dvoch hlavných vrstiev a to epidermis (pokožka) a dermis (corium, zamša), ktorá je vystlaná podkožným väzivom (tela subcutanea) ležiacim hlboko v koži [11, 13].

Tela subcutanea

Podkožné väzivo, nazývané tiež hypodermis je tvorené predovšetkým riedkym kolagénovým väzivom, ktoré pripája kožu so svalovým resp. s kostrovým tkanivom a umožňuje jeho posun. Vrstva obsahuje adipocyty, ktorých veľkosť a množstvo sa vzhľadom na rôzne oblasti tela líši. Cytoplazma adipocytov obsahuje významné množstvo lipidov, predovšetkým voľné mastné kyseliny a triglyceridy. Ďalšou stavebnou jednotkou Hypodermis je tukové tkanivo, vďaka ktorému má vrstva izolačnú, nutričnú a mechanicky ochrannú schopnosť [13, 16].

Dermis

Dermis predstavuje strednú vrstvu kože, ktorá dosahuje hrúbku 0,5-2,5 mm s bohatou inerváciou a sieťou kapilár. Jej základom sú kolagénové a elastické vlákna spoločne s väzivom. Hmota zamše je tvorená predovšetkým tromi hlavnými typmi buniek a to sú fibroblasty (syntéza väziva), mastocyty (žirné bunky obsahujúce vo svojej cytoplazme mediátory zápalu) a histiocyty (krvou prenikajúce monocyty, ktorých aktívnou formou sú makrofágy). Medzi prídavné orgány dermis patria žľazové (potné, mazové) a keratinizované adnexy, teda nechty a vlasy [11, 13]. Dermis je zložená z dvoch vrstiev a to **stratum papillare** a **stratum reticulare**, ktoré nie sú zreteľne rozdelené.

Stratum papillare

Predstavuje vrstvu lokalizovanú tesne pod epidermis. Je tvorená dermálnymi papilami, ktorú tvorí kolagénové väzivo typu VII, elastické väzivo spoločne s väzivovými bunkami. Ďalej sa v tejto vrstve nachádza sieť cievnych a lymfatických kapilár, čo má za následok úzke prepojenie s termoregulačným a imunitným systémom tela. Nachádzajú sa tu exteroceptory, ako **nociceptory** (vnímanie bolesti) a **mechanoreceptory** (vnímanie tlaku a dotyku). Ďalej sem patrí **Meissnerové teliesko** pre vnímanie jemného dotyku, **Vater-Paciniho teliesko** pre detekciu tlaku a vysokofrekvenčných vibrácií, **Krauseho teliesko** spojené s vnímaním nízko-frekvenčných vibrácií pohybu a **Ruffiniho teliesko**, ktorého funkcia je detekcia tkanivovej deformácie [11, 13, 14].

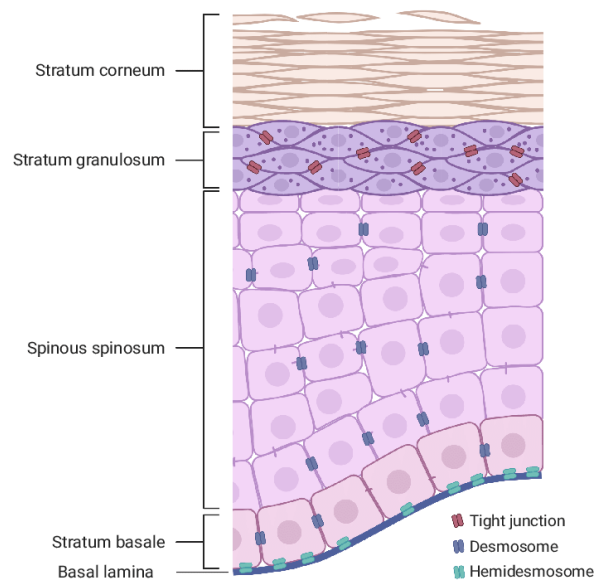
Stratum reticulare

Vrstva tvorená hustými zväzkami neusporiadaného kolagénového tkaniva typu I. V porovnaní so Stratum papillare je omnoho silnejšia a obsahuje väčší pomer vláknitej zložky a menej buniek. Pružnosť Stratum reticulare zaisťuje sieť elastických vlákien [13].

Epidermis

Je najvrchnejšou vrstvou kože, ktorej hrúbka sa pohybuje v rozmedzí od 0,3 do 1,5 mm. Tvorí ju rohovatejúci epitel, v ktorom prevažuje zastúpenie **keratinocytov** (až 95%). Ďalšími bunkami vyskytujúcimi sa v epidermis sú **melanocyty** (syntéza melaninu), **Langerhansové bunky** (bunky predkladajúce antigén) a **Merkelové bunky** (mechanoreceptory).

Podľa epidermis rozlišujeme hrubý typ nachádzajúci sa na dlaniach a tenký typ, ktorý pokrýva zvyšok tela. Epidermis je tvorená štyrmi vrstvami v tenkom type a piatimi vrstvami v hrubom type kože [11, 13, 17]. Toto usporiadanie môžeme vidieť na obrázku 2.



Obrázok 2 Schematický náčrt epidermis. Na obrázku môžeme vidieť usporiadanie hlavných vrstiev v epidermis. Obrázok neznázorňuje Stratum lucidum, keďže sa táto vrstva nenachádza vo všetkých oblastiach kože. Prevzaté z [researchgate.net/figure/Structure-of-the-epidermis-The-epidermis-shows-a-multilayered-architecture](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-epidermis-The-epidermis-shows-a-multilayered-architecture).

Zloženie a vlastnosti jednotlivých vrstiev Epidermis:

Stratum basale (cylindricum) je vrstva tvorená cylindrickými keratinocytmi, ktoré sú charakteristické svojimi veľkými jadrami v porovnaní s cytoplazmou. Okrem keratinocytov sa tu vyskytujú taktiež melanocyty a Merkelové bunky. Bunky spájajú tzv. desmosomy, ktoré umožňujú posun buniek epidermis smerom nahor. Pripojenie keratinocytov k bazálnej membráne sprostredkovávajú tzv. hemidesmosomy. V stratum basale dochádza k aktívnej proliferácii a vzniku nových buniek [11, 13, 14].

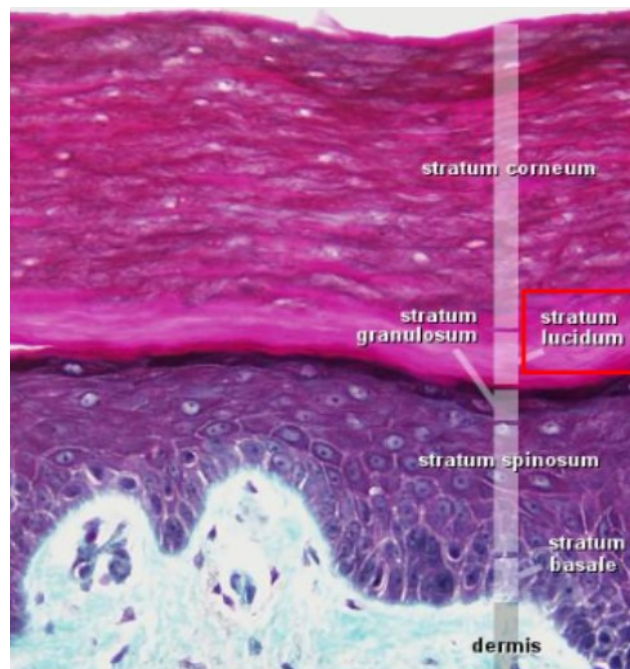
Stratum spinosum- je tvorená 2-5 vrstvami novovzniknutých buniek, ktorých tvar sa postupom k povrchu mení na charakteristický sploštený tvar. Okrem keratinocytov, v ktorých cytoplazme prebieha syntéza keratínu sa v tejto vrstve nachádzajú Langerhansové bunky a vznikajú tu Odlandové telieska (obsahujú glykolipidy a steroly). Keďže ako v stratum basale, tak aj v stratum spinosum dochádza k deleniu buniek, zvyknú sa spoločne označovať ako **stratum germinativum** (Vrstva zárodočná) [11, 13, 14].

Stratum granulosum- je tvorená 1 - 3 vrstvami buniek s granulami keratohyalínu (prekurzor keratínu). Granuly obsahujú profilaggrin, protein ktorý sa mení na filaggrin. Filaggrin sa viaže na keratinové vlákna v rohovej vrstve a tým ich spája. Po určitej dobe sa filaggrin rozkladá a vzniká z neho kyselina urokanová (ochrana kože pred UV žiarením) a kyselina pyrrolidonkarboxylová (súčasť kyslého plášťa kože). Po excitóze lipidov do medzibunkového priestoru sa z nich stáva nepriepustná hmota okolo buniek. Vnútorňú stranu plazmatickej membrány tvorí pruh keratinocytov, ktoré sú úplne zrohovatené pôsobením enzýmov [11, 13, 14].

Stratum lucidum je tenká svetlá eosinofilná vrstva, ktorá tvorí prechod medzi nezrohovateľnou časťou epidermis a SC. Je prítomná najmä v hrubom type kože. Tvoria ju bezjadrové keratinocyty, ktoré obsahujú eleidín (prekurzor keratínu) [11, 13, 14].

Stratum corneum predstavuje najvrchnejšiu vrstvu epidermis. Je tvorená úplne zrohovatenými keratinocytmi, ktoré sa postupom času odlupujú vo forme suchých šupín označovaných tiež stratum disjunction [14].

Na obrázku 3 môžeme vidieť jednotlivé vrstvy hrubej kože na dlani.



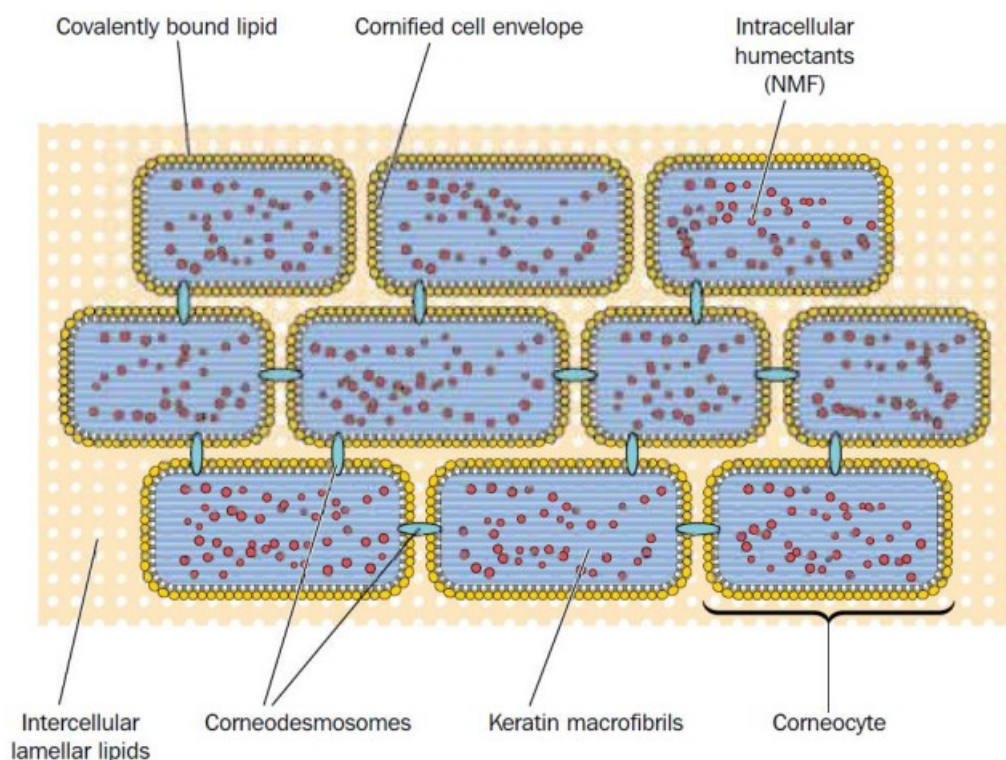
Obrázok 3 Histologický rez Epidermis. Obrázok zobrazuje rez hrubou kožou na dlani, kde môžeme vidieť všetky vrstvy epidermis vrátane stratum lucidum. Prevzaté z docplayer.cz/155990815-Kozni-pokryvka-integumentum-commune.html.

2.3. Stratum corneum

Najvrchnejšia vrstva kožnej bariéry, ktorá je v priamom kontakte s vonkajším prostredím. Hrá dôležitú rolu pri hydratácii, ktorá zabraňuje praskaniu kože a stratám vody z organizmu. Paradoxne je ale SC vrstva s najnižším obsahom vody. Taktiež slúži ako mechanická bariéra proti prieniku škodlivých látok do tela [18, 19].

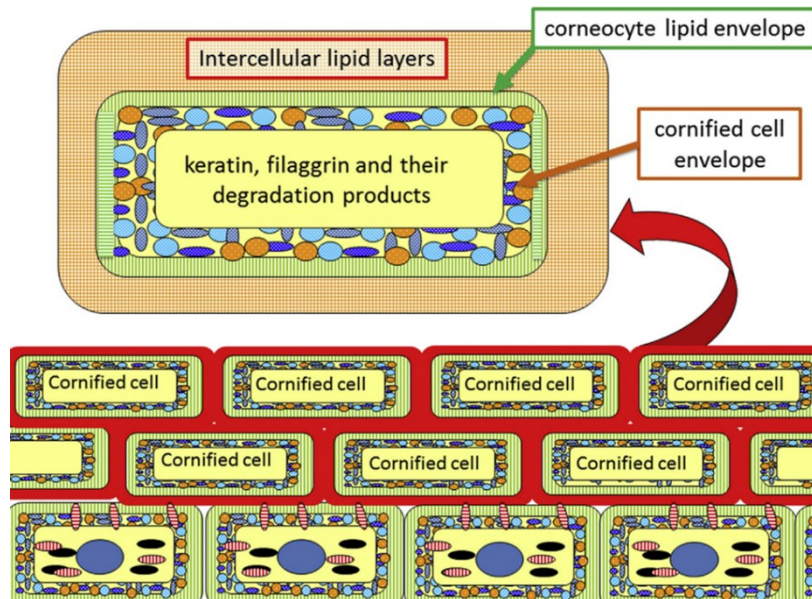
2.3.1. Stavba SC

SC môžeme charakterizovať, ako systém zložený z 15-20 vrstiev zrohovateľných a plošných buniek nazývaných korneocyty. Zjednodušene sa dá usporiadanie prirovnať k tehlovej stene, kde tehly predstavujú korneocyty a malta predstavuje lipidovú maticu. Z morfológického hľadiska sa dá SC rozdeliť na **Stratum conjuction** (hlbšia kompaktnjšia vrstva) a **Stratum disjunction** (bunky sa odlupujú od tela tzv. deskvamácia) [11, 17]. Na obrázku 4 môžeme vidieť model SC v zobrazení „tehál a malty“.



Obrázok 4 Schematický nákres SC v zobrazení modelu „tehál a malty“. Prevzaté z [researchgate.net/figure/Bricks-and-Mortar-model-of-the-stratum-corneum-taken-from-Voegeli-D-The-vital-role](https://www.researchgate.net/figure/Bricks-and-Mortar-model-of-the-stratum-corneum-taken-from-Voegeli-D-The-vital-role).

Korneocyty sú ploche vysoko diferencované keratinocyty v poslednom štádiu diferenciácie. Cytoplazma je tvorená predovšetkým hustou spleťou zosieťovaných fibrinóznych proteínov zo skupiny keratínov. Korneocyty absentujú obsahom jadra a bunkových organel. Prepojenia buniek medzi sebou sú zabezpečené pomocou desmozómov. Vonkajší obal korneocytov je tvorený tzv. **korneocytálnou obálkou** (CE; angl. cornified envelope). CE môžeme interpretovať ako vrstvu zasahujúcu do cytoplazmy korneocytov. Je tvorená komplexom zosieťovaných proteínov, ako napríklad involucrin, envoplain, lorikrin, SPR, fillagrin, elafín, cistatin A a ďalšie [11, 15]. Schematický náčrt CE spoločne s proteínmi a ich degradačnými produktmi môžeme vidieť na obrázku 5.

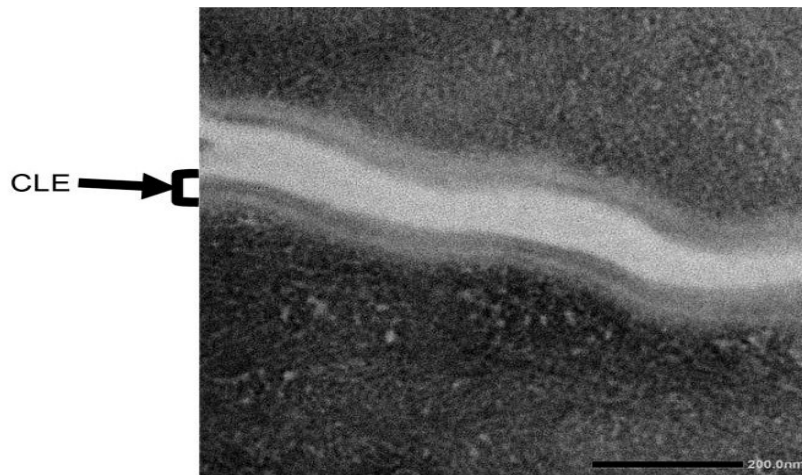


Obrázok 5 Schématický náčrt CE spoločne s proteínmi a ich degradačnými produktmi [1].

2.3.2. Lipidy v SC

Na povrchu CE je kovalentnými väzbami viazaná korneocytálna lipidová obálka, ktorá pravdepodobne slúži ako templát pre usporiadanie voľných extracelulárnych lipidov, avšak jej funkcia môže byť aj iná (napr. hydrofobizácia povrchu korneocytov) [20]. Intercelulárna hmota je tvorená predovšetkým zmesou Cer (50 %), FFA (10-20%) a voľného Chol (25 %), jedná sa o hmotnostné %. Medzibunková hmota je doplnená ďalšími zložkami, medzi ktoré patrí napríklad estery Chol a CholS. Ďalšími minoritnými zložkami sú napríklad triacylglyceroly a fosfolipidy [4].

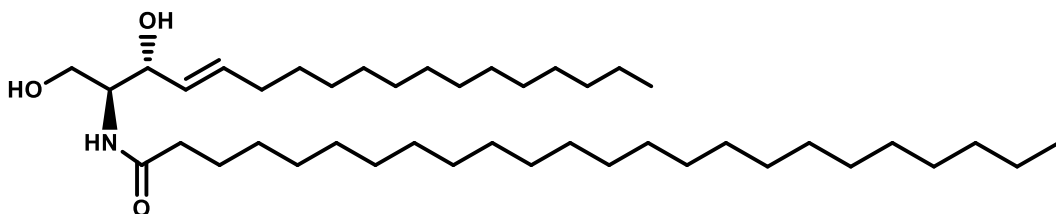
Lipidový matrix tvorí približne len 20% celkovej hmotnosti SC, ale aj napriek tomu je táto esenciálna zložka potrebná pre správnu funkciu kožnej bariéry [21]. Usporiadanie a zloženie lipidov v matrixe je kľúčové pre správnu funkciu SC a jej dysregulácia môže viesť k patologickým stavom, ako sú psoriáza, lamelárna ichthyóza, Northernov syndróm a atopická dermatitída [6]. Na obrázku 6 môžeme vidieť snímok z elektrónového mikroskopu zobrazujúci CLE.



Obrázok 6 Snímka z elektrónového mikroskopu. Obrázok zobrazuje korneocytálnu lipidovú obálku (CLE) [22].

2.4. Ceramidy

Cer sú súčasťou rodiny SL, čo znamená, že sú to látky odvodené od sfingoidných báz. Funkcia ale taktiež biosyntéza niektorých podtypov Cer zatiaľ nie je plne objasnená. Intracelulárne Cer sú dôležitou súčasťou regulačných a adaptačných procesov v bunke [2, 3]. Extracelulárne ich funkciu nachádzame prevažne na rôznych miestach nervovej sústavy, ale taktiež v koži [23, 24]. Na obrázku 7 je znázornený Cer NS, ako jeden z najbežnejšie sa vyskytujúcich Cer.



Obrázok 7 Cer NS.

2.4.1. Štruktúra

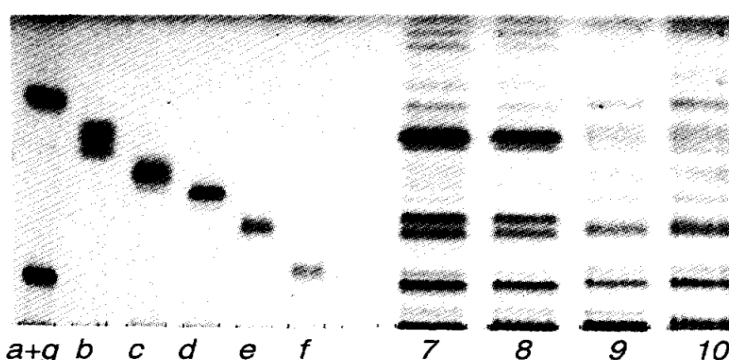
Kožné Cer sú zložené zo sfingoidnej bázy a acylového reťazca. Z chemického hľadiska sa jedná o amidy mastných kyselín s bazickým alkoholom s dlhým reťazcom (14-28C) [25]. Medzi najčastejšie zastúpené typy základných sfingoidných báz patrí S, P, dS a H, ktorého syntéza a jej optimalizácia bola náplňou tejto práce. Primárna amino skupina sfingoidnej bázy môže byť acylovaná buď nenasýtenou (N), α -hydroxylovanou (A), alebo ω -hydroxylovanou kyselinou (O). Cer ďalej môžu byť esterifikované najčastejšie kyselinou linolovou (LIN) v ω -polohe za vzniku ω -esterifikovaných acylov (EO). Taktiež je možná substitúcia v polohe 1 nesubstituovanou kyselinou za vzniku 1-O-AcylCer [26, 27]. Detailná analýza kožných Cer bola v nedávnej dobe publikovaná. V nej autori pomocou kvapalinovej chromatografie a tandemovej hmotnostnej spektrometrie detekovali a kvantifikovali 1327 voľných a 254 viazaných ceramidov [28]. Podľa lokalizácie v ľudskej koži sa môže líšiť dĺžka acylov. Všeobecne sa dĺžka acylového reťazca pohybuje od 16 do 36 C. Prítomnosť polárnych skupín a dĺžka reťazca je nevyhnutná pre správnu funkciu ľudskej kože [6]. V tabuľke 1 môžeme vidieť prehľad základných Cer.

| Sfingoidná báza | | | | |
|---------------------------------------|-------------|-------------------|-----------------|---------------|
| Ret'azec mastnej kyseliny | sfingoín | 6-hydroxysfingoín | dihydrosfingoín | fyto sfingoín |
| nesubstituovaná kyselina | Ceramid NS | Ceramid NH | Ceramid NdS | Ceramid NP |
| α -hydroxylovaná kyselina | Ceramid AS | Ceramid AH | Ceramid AdS | Ceramid AP |
| ω -esterifikovaná kyselina | Ceramid EOS | Ceramid EOH | Ceramid EoS | Ceramid EOP |
| ω -hydroxylovaná kyselina | Ceramid OS | Ceramid OH | Ceramid Os | Ceramid OP |

Tabuľka 1 Prehľad základných typov Ceramidov.

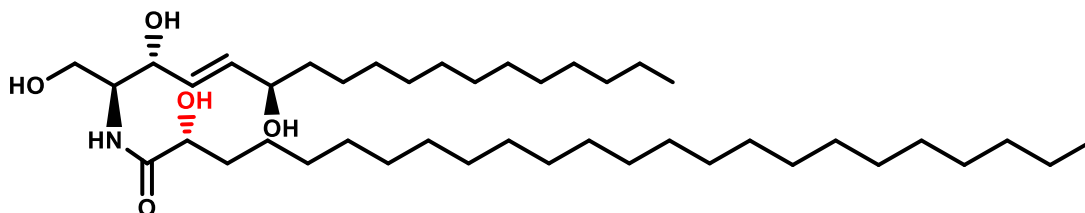
2.4.2. Nomenklatúra

Dnes najpoužívanejším označovaním Cer je nomenklatúra podľa Mottu Tento systém popisuje Cer kombináciou začiatočného písmena príslušnej sfingoidnej báze a písmeno označujúce typ substituovaného acylu [8]. Takže označenie Cer AH znamená, že sa jedná o Cer odvodený od H, ktorého acyl tvorí α -hydroxylovaná masťná kyselina (A) [5]. Základná nomenklatúra podľa Mottu bola publikovaná v roku 1993 , následne bola doplnená v rokoch 1994 [8] a 2014 [5]. Tento systém nahradil pôvodnú nomenklatúru, ktorá označovala Cer na základne priradených čísel podľa hodnoty R_f pri chromatografickom rozdelení epidermálnych Cer na doskách HPTLC (High performance thin layer chromatography) [29]. S objavom nových Cer (často na HPTLC koelujú s inými podtriedami) bola pôvodná číselná nomenklatúra nahradená prehľadnejším systémom podľa Mottu. Obrázok 8 predstavuje pôvodné označenie Cer podľa hodnoty R_f pri chromatografickom rozdelení.



Obrázok 8 Rozloženie Cer na HPTLC doske s označením podľa pôvodnej nomenklatúry: a) Cer[EOS] / Cer 1; b) Cer[NS] / Cer 2; c) Cer[NP] / Cer 3; d) Cer[NP] e) Cer[AS] / Cer 4/5; f) Cer[AP] / Cer 6I; g) Cer[AP] / Cer 6II. Chromatogramy 7 a 8 predstavujú Cer zo vzoriek psoriatickej kože. Chromatogramy 9 a 10 zobrazujú Cer zo vzoriek zdravej ľudskej kože [8].

Taktiež môžeme dodatočne doplniť informácie o dĺžke reťazca, počte hydroxylových skupín a polohe dvojitych väzieb. Tieto údaje sa uvádzajú v zátvorke a udávajú informácie o sfingoidnej báze (d odpovedá dvom OH skupinám, t trom OH skupinám atd., číslo pred dvojbodkou označuje dĺžku reťazca a číslo za dvojbodkou označuje počet násobných väzieb) a o acyle v tomto poradí. Takže označenie Cer AH (t18:1/24:0) predstavuje 6-hydroxysfingozín o dĺžke reťazca 18C s α -hydroxylovanou nasýtenou masťnou kyselinou o dĺžke 24C viazanú na jeho primárnu aminoskupinu. V dnešnej dobe sa zavádza nová nomenklatúra, ktorá SL (ale aj iné lipidy) charakterizuje ešte detailnejšie, obzvlášť pre potreby hmotnostnej analýzy, ale pre túto prácu je takáto nomenklatúra zbytočne komplikovaná [30]. Obrázok 9 zobrazuje Cer AH vrátane dĺžky reťazca, počtu OH skupín a násobných väzieb.



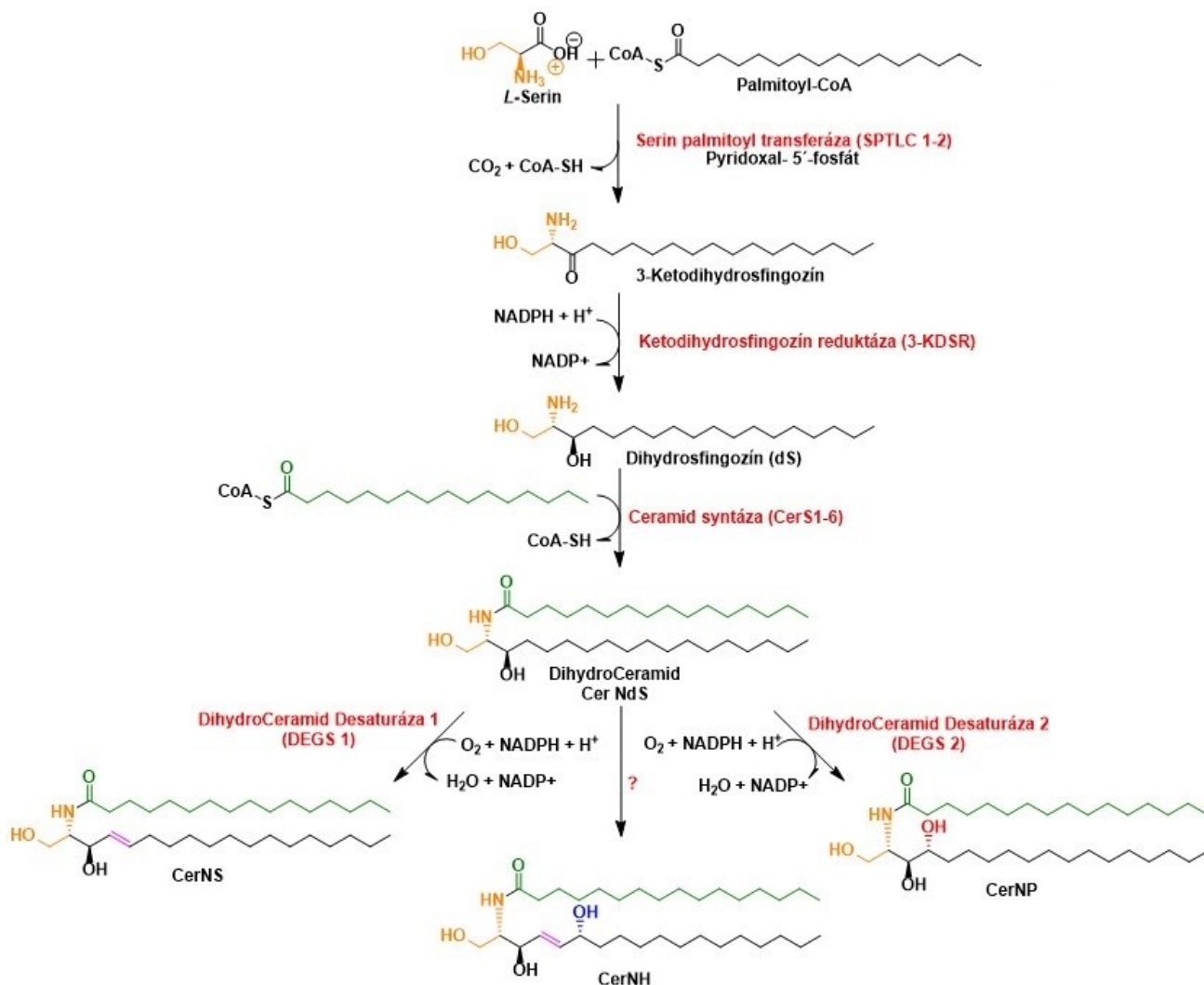
Obrázok 9 Cer AH (t18:1/24:0).

2.4.3. De novo Biosyntéza Ceramidov

De novo Biosyntéza SL prebieha predovšetkým v endoplazmatickom retikulu, neskoršie úpravy aj v Golgiho aparáte [25]. Biosyntéza vychádza zo spojenia *L*-Serínu a Palmitoyl-CoA enzýmom serín-palmitoyl transferáza (SPT), ktorý je katalyzovaný pyridoxal-6-fosfátom. Produktom reakcie je 18C sfingoidný skelet známy, ako 3-ketodihydrosfingozín (3-KDS). Tento krok sa označuje, ako tzv. rate-limiting step, takže sa jedná o reakciu určujúcu rýchlosť celej biosyntézy [31].

Druhým krokom biosyntézy je NADPH-dependentná redukcia C3 karbonylovej skupiny 3-KDS na alkoholickú za vzniku dihydrosfingozínu (dS). Tento krok je sprostredkovaný enzýmom 3-ketodihydrosfingozín reduktáza (3-KDSR). Vzniknutý dS sa pôsobením Ceramid syntázy (CerS) konvertuje na dihydroceramid pripojením acylu mastnej kyseliny z príslušného koenzýmu. Doposiaľ bolo objavených 6 podskupín CerS (CerS 1-6), ktoré odlišujeme na základe rozdielov miery exprese v rôznych tkanivách a rôznej substrátovej špecificity [32, 33].

Popis de novo biosyntézy Cer môžeme vidieť na obrázku 10.



Obrázok 10 De novo biosyntéza základných typov Cer.

Posledným krokom Biosyntézy je modifikácia sfingoidnej časti molekuly. Aktivitou desaturázy 1 (DEGS1) sa získavajú Cer odvodené od sfingoínu s *trans*-dvojitou väzbou na pozícii C4-C5. Cer odvodené od P sú v pozícii C4 hydroxylované za pomoci enzýmu desaturáza 2 (DEGS2) [25]. Posledný krok Biosyntézy Cer odvodených od H stále nie je plne pochopený, keďže doposiaľ neboli objavené enzýmy, ktoré sú zodpovedné za syntézu H [27].

2.4.4. Rola Ceramidov pri vzniku kožnej bariéry

Vznik kožnej bariéry je podmienený vytvorením správneho intercelulárneho matrixu. Začiatok tohto procesu je lokalizovaný v stratum basale, pokračujúc cez stratum granulosum až po stratum corneum. Proces vzniku kožnej bariéry môžeme rozdeliť do nasledujúcich štyroch krokov.

1.) Prvým krokom je syntéza epidermálnych lipidov. Pre svoju nízku cytoplazmatickú rozpustnosť a cytotoxické účinky sú Cer modifikované na Glukosylované Cer (GlcCer) a sfingomyelíny (SM) v Golgiho aparáte [5].

2.) Podstatou druhého kroku je tvorba tzv. lamelárnych teliesok. V lamelárnych telieskach nie sú uložené len epidermálne lipidy, GlcCer a SM, ale taktiež katabolické enzýmy. Defekt na úrovni tvorby týchto organel je spôsobený rôznymi typmi Harlekýnskej ichthyózy. Dochádza k mutácii génu pre transportný proteín ABCA12.

3.) Nasledujúcim krokom, ktorý prebieha na úrovni stratum granulosum je transport a splynutie lamelárnych teliesok s plazmatickou membránou korneocytov. Po splynutí lamelárnych teliesok a plazmatickej membrány dochádza k vyliatiu obsahu teliesok do intercelulárneho priestoru.

3.) Posledným krokom je vznik nepolárnych epidermálnych lipidov z pôvodne polárnych lipidových prekurzorov. Premena GlcCer je katalyzovaná glukocerebrosidázou a SM pôsobením sfingomyelinázy za vzniku finálnych Cer. Fosfolipidy sú enzymatickou aktivitou fosfolipázy prevedené na voľné masné kyseliny [39]. Takto vzniknuté kožné lipidy sa potom orientujú do lamiel.

2.5. H-ceramidy

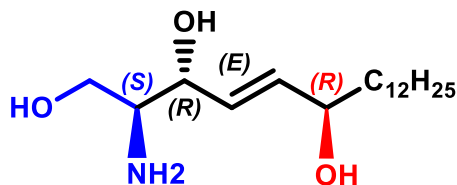
H-Cer sú látky odvodené od 6-Hydroxysfingoínu a v nomenklatúre podľa Mottu im je priradené písmeno H [8, 34]. Sfingoidné báze všeobecne nachádzame v celom tele, naproti tomu H bol zatiaľ pozorovaný len v koži. Stále nie je plne objasnené prečo ľudská koža syntetizuje tieto Cer obsahujúce vyšší počet hydroxylových skupín, ktoré prirodzene zvyšujú polaritu týchto nepolárnych látok.

Prvýkrát, kedy boli tieto SL s tromi hydroxylovými skupinami popisované bol rok 1989 [7]. Prvotným predpokladom však bola pozícia hydroxyly na C4. Avšak v roku 1992 bola publikovaná práca, ktorá poukázala na prítomnosť mononenasýtených sfingoidných báz s tromi hydroxylmi (t17:1, t18:1, t20:1) [35]. Objav z roku 1994, ktorý lokalizoval polohu tretej hydroxylovej skupiny v polohe C6 má na svedomí skupina Donalda T. Downinga. Na základe NMR spektroskopie lipidov v SC sa im taktiež podarilo popísať ďalšie nové Cer odvodené od

6-hydroxysfingozínu. Objav mal za následok pridanie písmena H do Mottového systému. Novoobjavené H-Cer sa dnes nazývajú Cer EOH, Cer AH a kovalentne viazaný Cer OH [36]. Ďalšia publikácia z roku 1995 skupiny Stewarda a Downinga poukázala na objav významných hladín H v ľudskej epidermis až 15 % celkového množstva sfingoidných báz. Posledným členom tejto rodiny H-Cer bol Cer NH, ktorý bol objavený 1999 opäť Downingovou skupinou [37]. Objav Cer NH bol problémový z dôvodu rovnakej retencie Cer AS a Cer NH (odlišuje sa len umiestnením jednej OH skupiny). Takže pomocou zvýšenia polarizácie HPTLC systému sa podarilo rozdeliť pôvodne jednu škvrnu na dve, z ktorých jedna bola práve popisovaný Cer NH. Ako sa ukázalo Cer NH predstavuje približne 9% celkových Cer v SC [38].

2.5.1. H-Ceramidy z bioorganického hľadiska

6-hydroxysfingozín, alebo (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-amino-oktadec-4-en-1,3,6-triol sa odlišuje od ostatných sfingoidných báz substitúciou hydroxylovej skupiny v polohe C6. Akým spôsobom je do molekuly zabudovaná hydroxylová skupina *in vivo* dodnes nie je plne objasnené, ale predpokladá sa účasť enzýmu podobného Desaturáze 2 (DEGS2) [34]. Obrázok 11 predstavuje štruktúru H.



Obrázok 11 Štruktúra 6-hydroxysfingozínu.

Vnesením tejto hydroxylovej skupiny do molekuly vzniká nové chirálne centrum. Všeobecne platí, že všetky sfingoidné bázy cicavcov sú v usporiadaní *D-erythro*, v absolútnej konfigurácii (2*S*,3*R*). Výnimkou je P a to z dôvodu zmeny priority substituentov, takže absolútna konformácia P odpovedá (2*S*, 3*S*). Absolútna konfigurácia H bola dokázaná porovnaním ¹H NMR spektier prírodných acetylovaných derivátov H-Cer a syntetických acetylovaných derivátov (6*S*) a (6*R*). Z toho vyplýva, že H-Cer vyskytujúce sa v ľudskej koži nesú finálnu konfiguráciu (2*S*, 3*R*, 4*E*, 6*R*) [39, 40].

2.5.2. Prehľad Syntéz 6-hydroxyceramidov

Doposiaľ bolo publikovaných 6 syntéz H-Cer, ktoré môžeme rozdeliť do dvoch skupín. Do prvej skupiny radíme 4 zo 6-tich syntéz využívajúcich alkynyláciu (*S*)-Garnerovho aldehydu ((*S*)-*tert*-butyl-4-formyl-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-karboxylát, (*S*)-GA) k tvorbe polárnej hlavy molekuly.

Druhú skupinu predstavujú zvyšné dve syntézy s odlišným prístupom tvorby H-Cer. Jedná sa o syntézu založenú na cross-metatéze s využitím Grubbovského katalyzátora [41] a syntézu poskytujúcu *syn*-selektívnu Borono-Mannichovu reakciu aziridinových aldehydov [42]. V ďalšej časti si predstavíme postupy využívajúce stratégiu alkynylácie (*S*)-GA.

(Yadav et al., Tetrahedron Letters, 2003) [43]

Príprava pozostávala z 10-tich krokov a činila celkový výtťažok 15% H. Syntéza vychádzala z reakcie propargylalkoholu a dodecylbromidu s $\text{LiNH}_2/\text{NH}_3$. Následne redukciou LiAlH_4 bol získaný *trans*-allylalkohol, ktorý vstupoval do ďalšieho kroku syntézy predstavujúci asymetrickú Sharplesovú epoxidáciu. Vzniknutý epoxid bol pôsobením trifenyfosfinu a NaHCO_3 prevedený na 2,3-epoxychlorid. Hlavným krokom syntézy bola následná reakcia príslušného 2,3-epoxychloridu s $\text{LiNH}_2/\text{NH}_3$ za vzniku chirálne aktívneho produktu. Vzniknutý alkynol v ďalšom kroku reagoval s (*S*)-GA.

(Chun et al., Journal of Organic Chemistry, 2003) [44]

Východiskovú látku syntézy predstavuje tridekanál, ktorý bol prevedený na α,β -nenasýtený ester pôsobením Horner-Wadsworth-Emmonsovej reakcie diisopropyl ester fosfonátu. Vzniknutý produkt bol v ďalšom kroku pomocou Sharplesovho katalyzátora asymetricky dihydroxylovaný. V nasledujúcom kroku bol pomocou 2,2-dimetoxypropánu v prítomnosti *p*-TsOH získaný acetonidový ester. Produkt bol v ďalšom kroku redukovaný pomocou DIBAL a následne prevedený na chlorid Mitsunobuovou metódou. Pomocou *n*-BuLi/HMPA bol príslušný produkt prevedený na alkynol, ktorý v ďalšom kroku reagoval s (*S*)-GA. Výtťažok syntézy predstavoval 25 % H a pozostávala z 10-tich krokov.

(Matsuda et al., European Journal of Organic Chemistry, 2005) [40]

Tento postup bol zameraný na prípravu Cer NH s celkovým výtťažkom 5 % v 10-tich reakčných krokoch. Prvým krokom syntézy bola etynylácia tridekanálu s následnou trimetylsilyláciou za vzniku racemickej zmesi produktov. Na separáciu enantiomerov bola využitá stereoselektívna Anastasiová reakcia vinylacetátu s alkynolom za enzymatickej katalýzy lipázy PS (Amino). Odchránením hydroxylovej skupiny pomocou K_2CO_3 bol získaný (*R*)-alkynol, ktorý vstupoval do reakcie s (*S*)-GA.

(Kováčik et al., RSC Advances, 2016) [10]

Princípom tejto syntézy bolo enzymatické oddelenie enantiomerov za vzniku (*R*)-alkynolu, tak ako v predchádzajúcom postupe. Reakčná schéma pozostávala z 9-tich krokov a výtťažok Cer NH predstavoval <1%. Nízka výtťažnosť bola spôsobená nízkou stabilitou produktov v kľúčových krokoch syntézy, ktorých optimalizácia je náplňou tejto práce.

(Syntéza využitá v tejto práci)

Východiskovou látkou bola racemická zmes alkynolu pripraveného v rámci iného projektu. Prvým krokom syntézy bolo ochránenie hydroxylovej skupiny alkynolu nasledovaný hlavným krokom syntézy, ktorým bola alkynylácia (*S*)-GA pomocou *tert*-BuLi a HMPA s následnou separáciou vzniknutých diastereomerov. Po ochránení hydroxyly nasledovala redukcia trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu. Tento krok môžeme označiť ako najkomplikovanejšiu časť syntézy, preto sme mu venovali obzvlášť veľkú pozornosť. Posledným krokom syntézy H bolo ochránenie polárnej hlavy pomocou TFA. Výtťažky syntézy neboli úplne ideálne, keďže sme behom práce narazili na niektoré komplikácie. H-Cer boli pripravené acylačnými reakciami na ktorých prípravu bol využitý práve H získaný v prvej časti syntézy.

2.5.2.1. Možnosti redukcie trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu

Keďže selektívna redukcia trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu je vo všeobecnosti komplikovaná v rámci organickej syntézy (obzvlášť v prípade komplikovaných substrátov), zamerali sme sa na jej optimalizáciu v príprave H-Cer. Táto kapitola sa bude venovať možnostiam zisku *E*-alkénov z alkínov.

Redukcie využívajúce alkalické kovy v kvapalných amínoch

V minulosti najviac využívanú metódu v príprave *trans*-dvojitej väzby predstavuje Birchová redukcia. Jedná sa o katalytickú hydrogenáciu roztokom alkalického kovu v kvapalnom amoniaku. Prvým krokom je prenos elektrónu do anti- väzbového π orbitálu, ktorý vytvorí radikálový anión. Ďalším krokom je protonizácia aniónu, nasledovaná ďalším prenosom elektrónu a konečná protonizácia prináša *trans* alkén [45]. Avšak aj napriek širokému využitiu metóda nie je vhodná predovšetkým pre zlúčeniny obsahujúce dlhé uhl'ovodíkové reťazce. Nízka výťažnosť je v tomto prípade spôsobená ich nízkou rozpustnosťou v kvapalnom amoniaku [46]. Schéma 2 zobrazuje mechanizmus Birchovej redukcie.

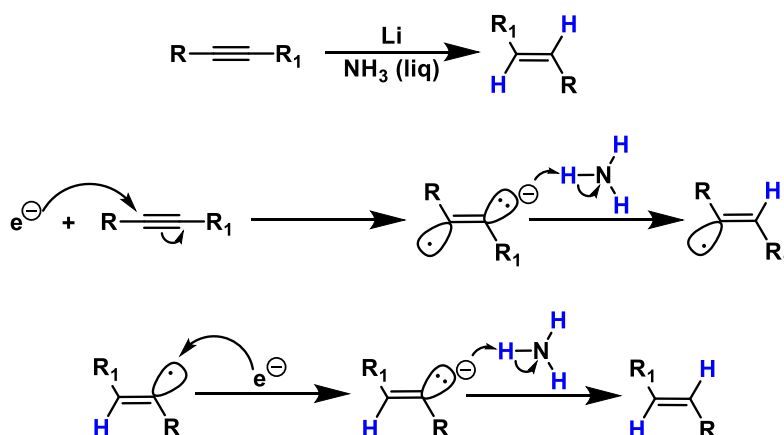


Schéma 2 Mechanizmus Birchovej redukcie.

Alternatívou tohto postupu bola obmena kvapalného amoniaku za nízkomolekulárne alifatické amíny (methyl-, ethyl-, propyl-) [47]. Následne snaha nahradiť etylamín vyššími alifatickými monoamínmi viedla k nižšej výťažnosti. Hlavným problémom bola zlá rozpustnosť lítia v týchto amínoch z dôvodu znižovania pomeru dusíka k uhlíku v molekule. Riešením bol etylendiamín (EDA), ktorý disponuje jednou aminoskupinou na každý atóm uhlíka. Tento postup bol popísaný ako „silne redukčný amino-kovový systém s nízkou selektivitou“ [48].

Ďalšou možnou obmenou pôvodného postupu je zámena amoniaku za diaminopropán (DAP), ktorý prináša viacero výhod oproti predošlým postupom. Rozpustnosť zlúčenín v DAP je celkom vysoká, preto môžeme použiť menšie množstvo rozpúšťadla. Oproti reakcii s EDA redukcia prebieha rýchlejšie a pri nižšej teplote, čo znamená menšie množstvo vedľajších produktov [49].

Redukcia s využitím LiAlH₄

Ďalšou možnosťou prípravy *E*-alkénov je *trans*-selektívna hydroaluminácia s využitím LiAlH₄. Mechanizmus tejto reakcie zahŕňa adíciu hydridu na uhlík, ktorý je menej schopný stabilizovať vznikajúci negatívny náboj [50]. Koordinácia hliníka na výsledný *trans*-vinylkarbanión vedie k zisku produktu s *trans*-konfiguráciou [51]. Rýchlosť adície hydridového iónu na trojitú väzbu je výrazne urýchlená prítomnosťou susednej hydroxylovej skupiny [52]. Selektivita hydroaluminácie u alkýnov obsiahnutých v reťazci je pomerne nízka pokiaľ substrát neobsahuje skupinu bohatú na elektróny, ako napríklad fenyl v konjugácii s alkínom [53]. Mechanizmus tejto reakcie môžeme vidieť na schéme 3.

Obdobným mechanizmom môžeme popísať redukcii s využitím diisobutylaluminium hydridu (DIBAL). Aj keď prednostne dostávame týmto postupom produkt s *cis*-konfiguráciou [54], stereošpecifitu reakcie môžeme upraviť zmenou rozpúšťadla. Použitie uhl'ovodíkového rozpúšťadla poskytuje *cis*-izomer, kdežto využitím terciárneho amínu ako rozpúšťadla získame produkt s *trans*-konfiguráciou [55].



Schéma 3 Mechanizmus *trans*-selektívnej hydroaluminácie s využitím LiAlH₄.

Redukcie s využitím katalyzátorov typu [Cp**Ru*]

V súčasnosti veľmi zaujímavou alternatívou v regioselektívnej príprave *trans*-dvojitých väzby predstavuje dvojkroková *trans*-selektívna Trostová hydrosilylácia za katalýzy [Cp**Ru*(CH₃CN)₃]. V prvom kroku sa alkín najskôr podrobí ruténium katalyzovanej adícii trietoxysilanu [56], po ktorej nasleduje protodesilylácia výsledných alkylsilanov pomocou fluoridových iónov [57]. Tento postup sa oproti predošlým postupom javí ako vhodnejší z hľadiska dobrej tolerancie funkčných skupín rôznych substrátov. Avšak optimalizácia tejto metódy prináša ešte vyššiu výťažnosť požadovaného produktu. Postup využíva vznik katalyzátoru *in situ* reakciou [Cp**Ru*(cod)Cl] s AgOTf pod tlakom vo vodíkovej atmosfére. To umožnilo skrátiť reakčný čas bez ohrozenia výťažku a selektivity [58].

Redukcia s využitím katalyzátora na báze irídia

Tento postup predstavuje prípravu *E*-alkénov založenú na vzniku irídiového komplexu *in situ* z [Ir(COD)Cl]₂ a nesymetrického fosfínového ligandu na báze ferocénu s využitím kyseliny mravčej, ktorý slúži ako donor protónu. Zaujímavosťou tohto postupu je fakt, že závislosť stereoselektivity reakcie je závislá na pomere ligandu ku kovu. Pomer 1:1 irídia k ligandu viedol k vzniku *Z*-alkénov, avšak pomer 1:2 viedol výlučne k vzniku *E*-alkénov [59].

2.6. Abnormality 6-hydroxyceramidov pri kožných ochoreniach

Koža postihnutá patológiou sa často líši od zdravej kože predovšetkým v zložení a usporiadaní lipidov v SC. Približne až 50% intercelulárnych lipidov zastupujú práve Cer. Predpokladá sa, že kolísavé hladiny Cer vedú k abnormalitám kožnej bariéry. Tieto rozdiely sú príznačné pre niektoré ochorenia. Hlavne u pacientov s atopickou dermatitídou AD bol pozorovaný celkový pokles hladín Cer v SC [34, 60]. V tabuľke 2 môžeme vidieť prehľad týchto ochorení [61].

| Ochorenie | Zmena hladín lipidov v SC |
|----------------------------|--|
| Lamelárna ichthyóza | Cer NP ↓, Cer EOS ↓ |
| Psoriáza | Cer EOP ↓, Cer NP ↓, Cer AP ↓, Cer AS ↑, Cer NS ↑ |
| Nerthertonov syndróm | Cer EOH ↓, Cer EOS ↓, Cer EOP ↓, Cer EOdS ↓ Cer NP ↓ nenasýtené lipidy ↑, lipidy s krátkym reťazcom ↑ |
| Atopická dermatitída | Cer EOH ↓, Cer NH ↓, CerEOS ↓, Cer EOP ↓ Cer AH ↑, Cer AS ↑, Cer AP ↑, Cer AdS ↑ |
| Chanarin-Dorfmanov syndróm | Acyl – Cer ↓, TAG ↑ |

Tabuľka 2. Prehľad vybraných ochorení charakteristických pre kolísavú hladinu Cer [61].

Už od objavenia H-Cer bola ich prítomnosť spájaná s kožnými ochoreniami. V koži s AD bola spozorovaná päťnásobne nižšia koncentrácia Cer NH. V suchej koži bola pozorovaná znížená hladina Cer EOH, Cer EOS a naopak zvýšená koncentrácia Cer NS a Cer AS. Prítomnosť Cer NH nebola popisovaná pravdepodobne z dôvodu koeluácie s Cer AS [62]. Použitím metódy LCMS boli v koži s AD namerané znížené hodnoty Cer EOH, Cer EOS, Cer EOP a naopak zvýšené hodnoty Cer AP, Cer AH [63]. Rovnaká skupina stojí za dôkazom korelácie medzi predikovanými faktormi AD (SCORAD systém - určujúce závažnosť ochorenia, TEWL, mutácia génu kódujúceho fillagrín) a zložením Cer v SC. Výhodiskom ostáva fakt, že s výskytom AD sa znižuje koncentrácia Cer NH, Cer EOH, Cer NP, Cer EOP a zvýši koncentrácia Cer AH, Cer AS a Cer NS. Taktiež bolo dokázané, že vhodným činiteľom funkcie kožnej bariéry môže byť dĺžka reťazcov prítomných Cer [64].

Dnes známe dáta týkajúce sa spojitosti kožných ochorení a H-Cer poukazujú na možnosť využitia suplementácie Cer v SC, pri terapii kožných ochorení v budúcnosti.

3. Výsledky a diskusia

Syntetická cesta využitá v tejto práci bola zameraná na optimalizáciu problémových krokov, ktorými sú alkynylácia (*S*)-GA a *trans*-selektívna redukcia trojitej väzby. Celková syntéza obsahuje 7 krokov, z ktorých 5 sme využili v tejto práci. Prvé dva kroky syntézy boli nutné na prípravu (*R/S*)-Pentadec-1-yn-3-olu z komerčne dostupného tridekanálu z TMS-acetylénu. Tento produkt predstavoval východiskovú látku pre našu prácu.

3.1. Schéma syntézy

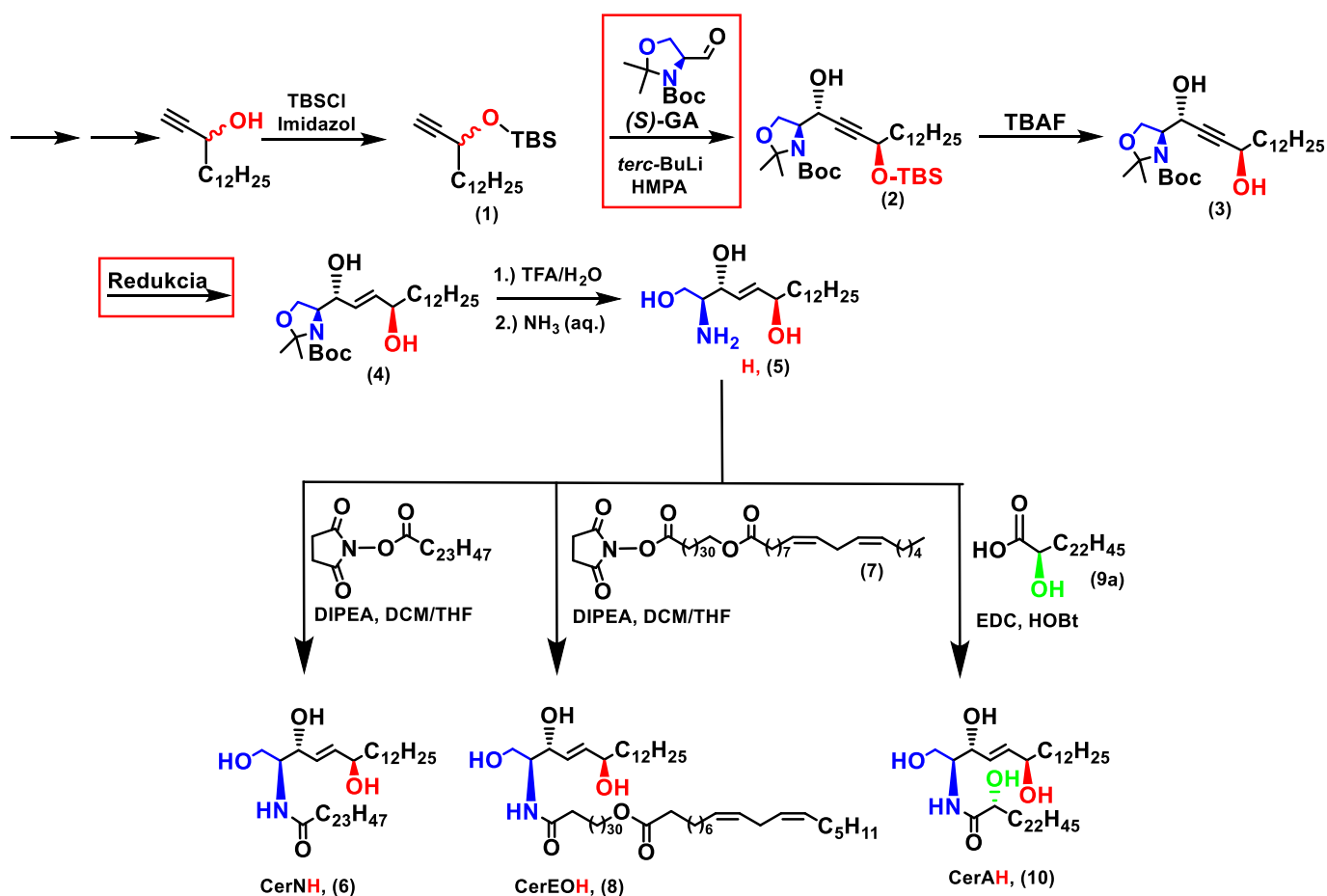


Schéma 4 Prehľad syntézy H-Cer využitej v tejto práci. V červených rámečkoch sú zobrazené najkomplikovanejšie kroky syntéz. Číslo v zátvorke pri štruktúrach predstavuje označenie jednotlivých produktov.

3.2. Syntéza 6-hydroxysfingozínu

Prvý krok syntézy predstavoval ochránenie voľnej hydroxylovej skupiny (*R/S*)-Pentadec-1-yn-3-olu pomocou *tert*-butyldimetylsilylchloridu v prostredí imidazolu, ktorý slúžil ako báza pre vychytávanie vzniknutých kyslých protónov. Tento krok bol nutný z dôvodu využitia *tert*-BuLi ako silnej báze v ďalšom kroku a voľná hydroxylová skupina by s ním mohla reagovať za vzniku nechcených produktov. Reakcia prebehla takmer kvantitatívne s výtťažkom 99 % za vzniku (*R/S*)-3-(*tert*-butyldimetylsilyloxy)pentadec-1-ynu (**1**), čo je prvý kľúčový prekursor pre reakciu s GA. Schéma 5 zobrazuje prvý krok syntézy H.

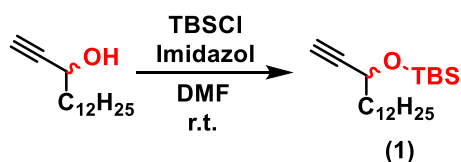


Schéma 5 Ochránenie hydroxylovej skupiny alkynolu.

Ďalším krokom bola alkynylácia (*S*)-GA v prítomnosti silnej báze. Tento krok môžeme označiť ako kľúčový, keďže dochádza k tvorbe polárnej hlavy molekuly. Do reakcie vstupovala racemická zmes (*R/S*)-3-(*tert*-butyldimetylsilyloxy)pentadec-1-ynu (**1**), ktorá reagovala s (*S*)-GA v prítomnosti *tert*-BuLi za vzniku (**2**). Pre vyššiu výtťažnosť požadovaného diastereomeru (*3S,4R,6R*) bol do reakčnej zmesi pridaný HMPA [65], ktorý mal podporiť vznik *anti*-produktu nukleofilnej adície. Reakcia prebiehala za zníženej teploty (-82°C) v bezvodom THF za vzniku 4 diastereomérov. Tieto diastereoméry nevznikajú v rovnakom množstve. Vďaka prídavku HMPA do reakčnej zmesi vzniká najväčšie množstvo požadovaného produktu a ostatné diastereoméry vznikajú v menšom množstve. Následne bola získaná zmes separovaná pomocou viacnásobnej stĺpcovej chromatografie na silikagele. Každý z diastereomérov má rozdielnu hodnotu retenčného faktoru, avšak tieto rozdiely sú pomerne malé, preto je táto separácia komplikovaná. Schéma 6 zobrazuje alkynyláciu (*S*)-GA.

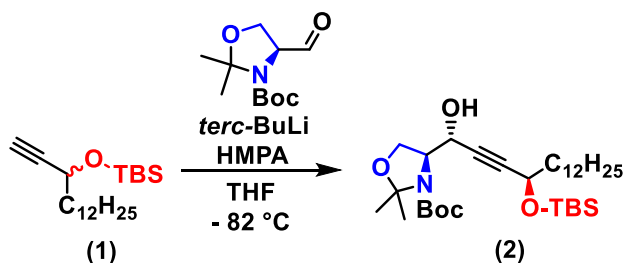


Schéma 6 Alkynylácia (*S*)-GA.

Priebeh tejto nukleofilnej adície na (*S*)-GA môžeme popísať pomocou teoretických modelov, ktorými sú Cram-Chelatačný model a polárny Felkihn-Ahnov model.

Cram-Chelatačný model

Model zobrazuje Cram chelatačný komplex, ktorý je stabilizovaný v prostredí polyvalentných iónov. Karbonylová skupina je natočená k substituentu s najväčším dipólovým momentom, v dôsledku čoho pristúpi nukleofil zo sterickej najviac prístupnej strany [66]. Prídavok HMPA ma za úlohu vychytať polyvalentné ióny, ktoré by stabilizovali vzniknutý komplex. Schéma 7 zobrazuje Cram-Chelatačný model nukleofilnej adície (*S*)-GA s prídavkom HMPA.

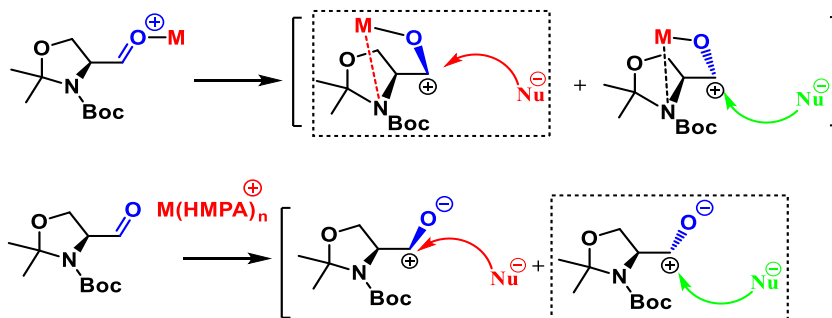


Schéma 7 Cram-Chelatačný model v zobrazení nukleofilnej adície (S)-GA, M predstavuje polivalentný ión.

Polárny Felkin-Ahnov model

Tento model zobrazuje usporiadanie substituentov s najväčším polaritným vektorom, ktoré sa orientujú opačne od sp^2 hybridizácie karbonylového uhlíka. Následne nukleofil prístupí zo stéricky najvhodnejšej strany za vzniku požadovaného *anti*-produktu [67]. Tento model zobrazený na schéme 8 lepšie vysvetľuje dáta experimentálne získané v rámci iného projektu, ktorého jedným z cieľov bolo sledovať zmenu stereoselektivity prídavkom HMPA (nepublikované výsledky).

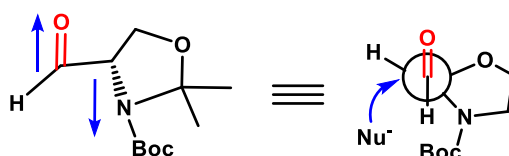


Schéma 8 Nukleofilná adícia (S)-GA v zobrazení polárneho Felkin-Ahnoveho modelu, šípky predstavujú opačný polaritný vektor substituentov.

Reakcia bola postupne optimalizovaná zmenou fyzikálnych a chemických reakčných podmienok. Oproti pôvodnému postupu, v ktorom sa pracovalo s teplotou v rozmedzí 0 - 40 °C sme pri práci používali teplotný interval -74 - -82 °C a taktiež sme zmenili reakčný čas z pôvodných 24 - 48 hod na 16 - 66 hod. Ďalej sme sa venovali prídavku *tert*-BuLi a jeho vplyvu na výťažnosť. Takýmto spôsobom sme získali požadovaný produkt s výťažkom 19 % - 51 %. Najuspokojivejšie výsledky sme dosiahli pri zachladení reakčnej zmesi na - 82 °C s prídavkom 2,0 ekv *tert*-BuLi a predĺžením reakčného času na 40 hod, kedy sme z reakcie získali 51 % požadovaného diastereoméru. Tento postup sa javí ako najvhodnejší, keďže pri opakovaní postupu bol z reakcie získaný požadovaný produkt v rozmedzí 48 - 51 %. Predĺžením reakčného času a zachladením reakčnej zmesi na - 82 °C sa znížilo množstvo nezreagovanej východiskovej látky a taktiež došlo k vzniku zvyšných 3 diastereomerov v nižšej miere. V pôvodnom postupe bola na separáciu získanej zmesi produktov využitá mobilná fáza, Hexán/EtOAc, gradientová elúcia (30/1, 15/1, 1/1). Avšak tieto podmienky sme boli nútení pozmeniť, keďže nedošlo k oddeleniu diastereomérov a z reakcie bol izolovaný výsledný produkt v nižšej miere oproti zmesi zvyšných 3 diastereomérov. Použitím konštantnej mobilnej fázy Hexán/EtOAc 50/1 sa výrazne zvýšila schopnosť separácie požadovaného produktu separačným systémom aj napriek predĺženiu času separácie. Podarilo sa nám potlačiť vznik zvyšných troch diastereomerov. Problémom však stále zostáva výťažnosť a stabilita požadovaného produktu pri separácii zmesi diastereomérov. Prehľad výsledkov môžeme vidieť v tabuľke 3.

| Teplota | Reakčný čas | Terc-BuLi (ekv.) | Výtťažok produktu (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>R</i>) | Nedeliteľná zmes zvyšných 3 diastereomerov | Nezreagovaná východisková látka |
|---------|-------------|------------------|---|--|---------------------------------|
| -74°C | 16 hod. | 1,2 | 19% | 10% | 54% |
| -78°C | 16 hod. | 1,6 | 44% | 15% | 32% |
| -78°C | 32 hod. | 1,8 | 49% | 18% | 22% |
| -78°C | 66 hod. | 2,0 | 42% | 24% | 14% |
| -82°C | 40 hod. | 2,0 | 51% | 14% | 20% |

Tabuľka 3 Prehľad výsledkov optimalizácie nukleofilnej adície (1) na (S)-GA.

Ďalším krokom navrhutej syntézy bolo ochránenie (2) pomocou fluoridových aniónov (TBAF) v bezvodom THF. Táto reakcie prebehla takmer kvantitatívne za vzniku 99 % (3), ktorý predstavoval východiskovú látku v nasledujúcom a najzložitejšom kroku syntézy. Na schéme 9 môžeme vidieť reakciu ochránenia hydroxylovej skupiny.

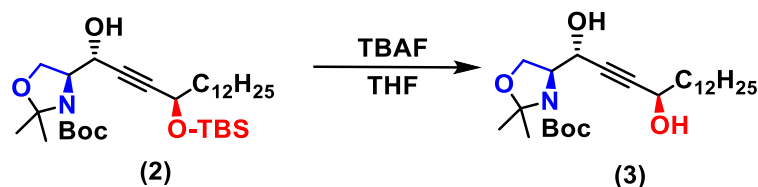


Schéma 9 Odchránenie hydroxylovej skupiny (2) za vzniku (3).

Nasledujúcim krokom syntézy bola redukcia trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu, ktorá je zobrazená na schéme 10. Na redukcii sme využili celkovo 8 postupov, ktoré pozostávali ako z rozdielných typov reakcií, tak i optimalizácia podmienok pre konkrétne reakčné typy.

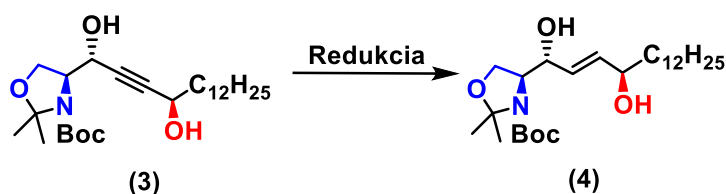


Schéma 10 Redukcia trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu vo všeobecnosti.

Prvým využitým postupom bola dvojkroková *trans*-selektívna Trostová hydrosilylácia s následnou protodesilyláciou [56, 57]. Prvým krokom bola adícia trietoxysilanu na trojitú väzbu s využitím ruténiového katalyzátora v bezvodom acetóne pri 0°C. Druhý krok predstavoval odštiepenie trietoxysilylovej skupiny pomocou fluoridových aniónov. Táto reakce bola už skôr využitá k redukcii rovnakého substrátu v rámci našej pracovnej skupiny, avšak jej výtťažky boli veľmi kolísavé. Preto bola v tejto práci zvolená ako prvá voľba a s ňou boli potom porovnávané ostatné reakcie. Schéma 11 zobrazuje *trans*-selektívnu Trostovu hydrosilyláciu.

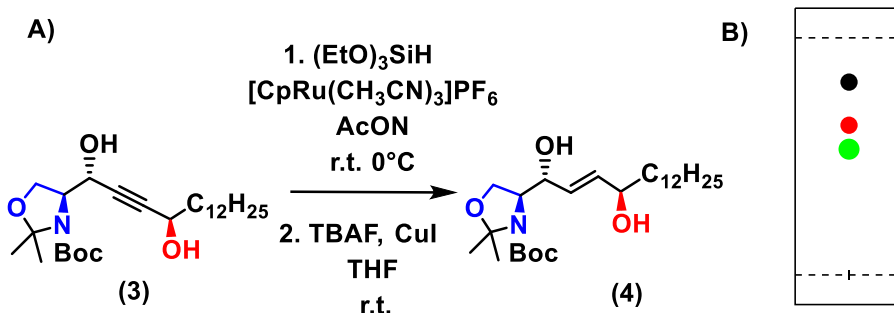


Schéma 11 A) Trostová *trans*-selektívna hydrosilylácia s následnou deprotosilyláciou.
 B) TLC doska po priebehu reakcie, čierna škvrna (3), zelená škvrna požadovaný diastereomer, červená škvrna nechcený diastereomer. Mobilná fáza Hexán/EtOH 1:1.

Výsledná reakčná zmes obsahovala zmes dvoch diastereomérov, ktoré vznikli vďaka racemizácii v priebehu reakcie aj napriek tomu, že do reakcie vstupoval len jediný enantiomér. Tejto racemizácii sa nedá celkom vyhnúť, avšak pri nízkej reakčnej teplote je možné ju značne znížiť. Separáciu týchto diastereomérov sa nám podarilo aspoň čiastočne optimalizovať mobilnou fázou Hexán/EtOH 6,5:1.

Tento pomer bol zvolený z dôvodu, že použitím rýchlejšej mobilnej fázy nedochádzalo k separácii a z chromatografického systému boli oba diastereoméry eluované súčasne. Použitím pomalšej mobilnej fázy elúcia požadovaného diastereomeru zabrala oveľa väčšie množstvo času s rovnakým výsledkom separácie. Problémom bola skutočnosť, že sa nám zakaždým podarilo oddeliť len určitú časť produktu zo zmesi a boli sme nútení zvoliť viacnásobné čistenie získanej zmesi. Reakcia bola opakovaná niekoľkokrát avšak výsledky sa líšili od 33 % do 56 %. Táto reakcia je veľmi citlivá na prítomnosť vody, problémom je aj komerčná nedostupnosť bezvodého acetónu, takže je nutná predestilácia acetónu za využitia molekulových síť. Ďalším problémom je i kvalita katalyzátoru, ktorý je síce komerčne dostupný, avšak vizuálne nevyzerá vždy rovnako. Aj napriek najlepšie dosiahnutým výsledkom sa tento postup nejaví ako ideálny v redukcii nášho substrátu ako z dôvodu problémov popísaných vyššie, tak z dôvodu náročného a zdĺhavého prevedenia tejto reakcie

Druhým typom redukcie využitým v tejto práci bola *trans*-selektívna hydroaluminácia s využitím LiAlH_4 v bezvodom THF. Tento postup sa javil, ako vhodnou alternatívou Trostovej dvojkrokovej redukcie aj napriek nižšej výťažnosti. Tento postup predstavuje jednoduchšiu manipuláciu s reakciou a taktiež kratší reakčný čas. Ďalšou výhodou sa javí aj použitie komerčne dostupnejšieho bezvodého THF. Výsledkom tohto postupu bol zisk zmesi dvoch diastereomérov, ako v predošlom postupe. Separácia výslednej zmesi pomocou mobilnej fázy Hexán/EtOAc gradientovou elúciou (7/1; 5/1; 3/1) bola menej náročná ako v predchádzajúcom prípade. Výhodou tohto postupu je, že východisková látka reaguje vo vyššej miere ako v postupe predošlom. Opakovaním tohto postupu sa nám podarilo získať požadovaný produkt s výťažnosťou 38 – 47 %. Problémom však stále ostáva fakt, že vznik požadovaného diastereoméru je takmer ekvivalentný zisku nežnámeho diastereoméru. Reakcia je znázornená na schéme 12.

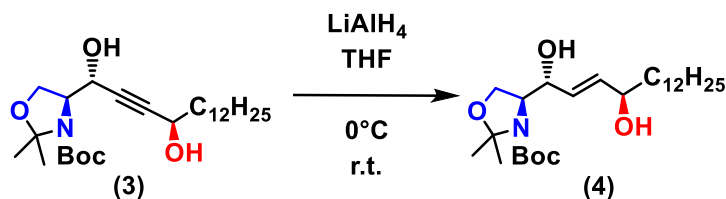


Schéma 12. Popis *trans*-selektívnej hydroaluminácie.

Ďalšie postupy použité na redukciu trojitej väzby boli po vzore Birchovej redukcie, ktorá využíva redukčné vlastnosti alkalických kovov rozpustných v amoniaku. Reakcia je charakteristická vznikom modrého až fialového oblaku solvatovaných elektrónov aktivovaného lítia v kvapalných amínoch. V nasledujúcich postupoch sme sa snažili zmenou rozpúšťadla vytvoriť prostredie pre redukciu trojitej väzby substrátu (**3**). Bohužiaľ ani jeden z týchto postupov nefungoval. Redukcia s využitím lítia v amoniaku bola v minulosti skúšaná v našej pracovnej skupine a táto reakcia neposkytuje vysoké výťažky, preto nebola znovu skúšaná [34]. Vhodným rozpúšťadlom v rámci pracovnej skupiny sa ukázal skvapalnený ethylamín, avšak táto látka v súčasnosti nie je komerčne dostupná v primeranom množstve (dostupné sú len jej soli alebo vodné roztoky), a preto sme hľadali alternatívy. Pri použití **EDA** bola problémom teplota tuhnutia ktorá sa pohybuje okolo 11 °C a neumožňuje tak reakciu pri zníženej teplote, čo býva z pravidla podmienkou pre tvorbu oblaku solvatovaných elektrónov. Prídavok THF umožňuje znížiť teplotu reakčnej zmesi bez toho aby stuhla, ale nevzniká požadovaný oblak elektrónov reprezentovaný modrým sfarbením. Alternatívou bolo použitie propylamínu (**PA**), ktorý umožňuje pracovať aj za zníženej teploty. Po pridaní **PA** ku kovovému lítiu pri -75 °C došlo k vzniku fialového komplexu. Postupom času sa však roztok odfarbil za vzniku bieleho zákalu. Môžeme teda povedať, že redukčné prostredie v reakcii bolo vytvorené, avšak neudržalo sa po dostatočne dlhú dobu, aby došlo k samotnej reakcii s východiskovou látkou tejto redukcie. Rovnaký výsledok nasledoval aj s využitím **DAP** a taktiež s predestilovaným **DAP** pomocou CaO (aby boli odstránené všetky potenciálne stopy vody). V tabuľke 4 môžeme vidieť všetky postupy využité k redukcii trojitej väzby.

| Reakčná zmes | Počet opakovaní | Teplota | r.t. | Výťažok |
|-------------------------|-----------------|---------|----------|---------|
| Trostová hydrosilylácia | 4 | 0 °C | 16 hod. | 33-56% |
| LiAlH ₄ /THF | 4 | 0 °C | 4-5 hod. | 38-47% |
| Li/EDA | 1 | -15 °C | X. | X |
| Li/PA | 1 | -75 °C | 1 hod. | X |
| Li/DAP | 1 | 25 °C | 48 hod. | X |
| Li/DAP, THF | 1 | 0 °C | 48 hod. | X |
| Li/DAP destilovaný | 1 | 0 °C | 48 hod. | X |

Tabuľka 4 Výsledky využitých postupov v trans-selektívnej redukcii trojitej väzby.

Z experimentálne získaných výsledkov sa ako vhodná metóda redukcie trojitej väzby javí postup s využitím LiAlH₄. Hlavnou výhodou postupu je jednoduchosť prevedenia reakcie, vysoká opakovateľnosť postupu, stabilné výťažky a taktiež jednoduchšia separácia požadovaného diastereoméru (**4**), aj napriek tomu, že využitím Trostovej hydrosilylácie dosiahneme vyššie výťažky, avšak rozdiel nie je príliš významný a reakcia je zaťažená významným kolísaním výťažnosti. Problémom stále ostáva separácia zmesi vzniknutých diastereomérov.

Záverečným krokom navrhutej syntézy **H** (**5**) bolo ochránenie polárnej hlavy (**4**) pomocou silnej organickej kyseliny. Táto reakcia ako jediná z navrhutej schémy prebiehala vo vodnom prostredí, ostatné reakcie prebiehali v argónovej atmosfére. Keďže východisková látka nebola v roztoku trifluoroctovej kyseliny (TFA/H₂O, 3,75/1) dostatočne rozpustná, reakcia prebiehala v suspenzii. Druhým krokom reakcie bola alkalizácia roztoku pomocou nasýteného vodného roztoku NH₃ na pH = 9. Schéma 13 popisuje vznik **H** (**5**).

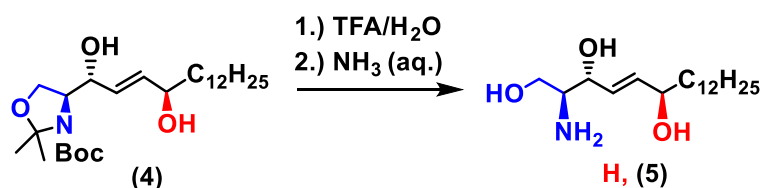


Schéma 13 Vznik H odchránením polárnej hlavy.

Vzniknutý H bol následne čistený pomocou stĺpcovej chromatografie. Tento krok bol taktiež podstatnou časťou zisku H, keďže ide o lipofilný primárny amín. Separácia na mierne kyslom silikagéli bola náročná a zdĺhavá z dôvodu retencie H na stĺpci. Riešením bolo pridanie vodného roztoku NH_3 do mobilnej fázy. Výsledná mobilná fáza bola $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ aq. 100/6,5/1. Zníženie množstva MeOH alebo zvýšenie množstva vodného amoniaku nie je možné, pretože inak sa jednotlivé zložky mobilnej fázy od seba separujú. Opäť sme sa stretli s problémom vzniku racemickej zmesi produktov behom čistenia, ale už vo výrazne nižšej miere ako tomu bolo v predošlých krokoch. Pre vyššiu účinnosť delenia zmesi sme boli nútení spomaliť mobilnú fázu, čo napomohlo k vyššej miere zisku požadovaného diastereoméru. Vzniknutý H (6) s výťažkom 71 - 75 % bol následne využitý k príprave H-Cer.

Výťažok celkovej syntézy H činil 21 %. Použitá syntéza sa oproti predošlým postupom javí ako kratšia, efektívnejšia a jednoduchšia cesta k zisku fyziologických H. Problémom stále ostáva racemizácia a stabilita vzniknutých produktov, ktorá komplikuje čistenie jednotlivých reakcií a taktiež znižuje výťažnosť navrhnujetej schémy.

Celkové množstvo, s ktorým sme v príprave (1) pracovali, bolo 1,54 g východiskovej látky. Následne na prípravu prípravu (2) bolo použitých celkovo 4,62 g (1). Na prípravu (3) bolo využitých 3,23 g (2). Experimentálne získané výsledky naznačujú, že prvé 3 kroky navrhnujetej syntézy poskytujú rovnaké výsledky ako v navážkach na jednotky miligramov, tak v navážkach na jednotky gramov. Príprava (4) bola vykonaná viacerými spôsobmi a z pôvodných 3,227 g (3) bola na optimalizáciu využitá značná časť materiálu, z ktorého sa nám nie vždy podarilo opäť izolovať východiskovú látku (3). Keďže tento krok predstavuje najzložitejší krok navrhnujetej syntézy, bola separácia a izolácia stáleho produktu mnohonásobne optimalizovaná a veľmi komplikovaná. Výsledný produkt (4) bol po mnohonásobnom prečistení v množstve 0,29 g použitý na prípravu (5). Keďže veľké množstvo materiálu bolo využité na optimalizáciu celkovej syntézy, posledné dva kroky neboli skúšané v navážkach na jednotky gramov, takže momentálne nevieme určiť, či navrhnuté reakcie dávajú rovnaké výťažky vo vyšších navážkach ako jednotky miligramov. Toto bude overené v rámci budúcich projektov.

3.3. Syntéza 6-hydroxyceramidov

Získaný H slúžil ako skelet, na ktorý sme pomocou acylačných reakcií pripojili príslušné acyly k vytvoreniu všetkých podtypov H-Cer.

Syntéza **Cer NH** pozostávala z reakcie H a aktivovanej kyseliny lignocerovej (LIG) s prídavkom diisopropylethylamínu (DIPEA) v bezvodom prostredí DCM/THF. V tomto postupe bol využitý prekurzor LIG prevedený na sukcinimidylester, ktorý bol pripravený v rámci iného projektu (reakcií LIG s *N*-hydroxysukcinimidom v prítomnosti karbodiimidu). Reakcia prebiehala 30 hodín za laboratórnej teploty. Výsledná zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie mobilnou fázou CHCl₃/MeOH 50:1. Výťažok reakcie predstavoval 90 % čistého Cer NH. Na schéme 14 môžeme vidieť reakciu prípravy Cer NH.

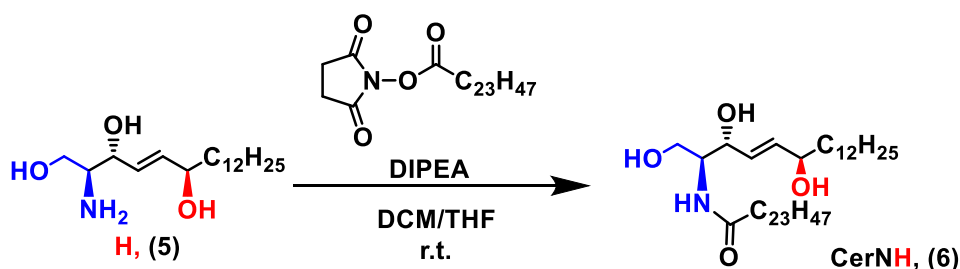


Schéma 14 Príprava Cer NH.

Syntéza **Cer EOH** prebiehala za rovnakých reakčných podmienok ako príprava Cer NH. Na prípravu ultradlhého acylu (ULA) (7) bola použitá Yamaguchiho esterifikácia využitím sukcinimidylesteru 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny pripraveného v rámci iného projektu [29], ktorý bol esterifikovaný LIN použitím 2,4,6-trichlorobenzoylchloridu, trietylamínu (TEA) a dimetylamínopyridínu (DMAP) v prostredí THF za vzniku diesteru [68]. Získaná zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie mobilnou fázou CHCl₃/MeOH 100/1 so ziskom 78% požadovaného produktu.

Zavedením sukcinimidylesteru ako chrániacej skupiny sa zvýšila stabilita príslušnej ω -hydroxylovanej mastnej kyseliny behom reakcie a odstránil sa problém s rozpustnosťou [69]. Výsledná zmes po reakcii H s príslušným diesterom bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie s mobilnou fázou CHCl₃/MeOH 50/1. Problémom bol vznik troch produktov ktorých separáciou sme získali Cer EOH s výťažkom 54%. Domnievame sa, že vznik viacerých produktov bol zapríčinený pravdepodobne opäť nestabilitou H, u ostatných zástupcov ω -esterifikovaných Cer sa výťažky pohybujú okolo 90 %. Postup prípravy Cer EOH zobrazuje schéma 15.

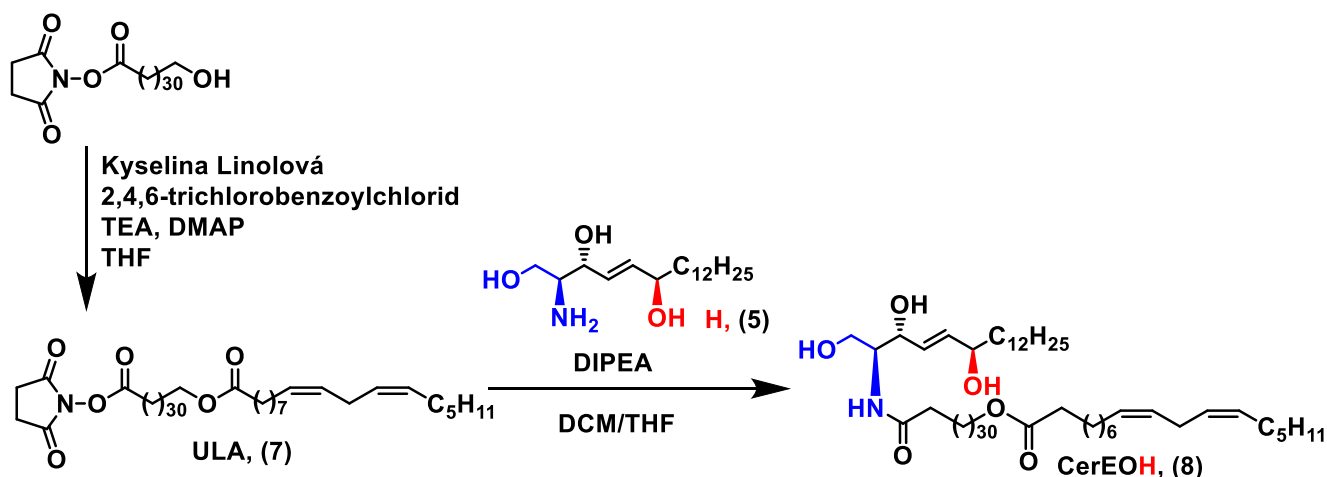


Schéma 15 Príprava CerEOH s využitím ULA prevedeného na sukcinimidylester.

Pokus o prípravu Cer AH prebiehal odlišným spôsobom, ako príprava predošlých Cer. Do reakcie vstupoval H spoločne s opticky čistou (*R*)-cerebrónovou kyselinou (*R*)-CA, ktorej príprava je popísaná v nasledujúcej kapitole. Do reakcie vstupovala (*R*)-CA v prítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu (HOBt) a *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-etylkarbodiimiu (EDC) v bezvodom prostredí THF/DMC. Prídavok HOBt a EDC bol dôležitý pre zvýšenie selektivity v tvorbe amidu oproti esteru. Po ukončení reakcie bola získaná zmes čistená pomocou stĺpcovej chromatografie mobilnou fázou CHCl₃/MeOH 50/1. Bohužiaľ Cer AH sa nám týmto postupom nepodarilo získať. Z reakcie bola izolovaná neznáma látka s podobnou štruktúrou. NMR analýza neznámeho produktu však štruktúru Cer AH plne nepotvrdila. Schému prípravy Cer AH zobrazuje schéma 16.

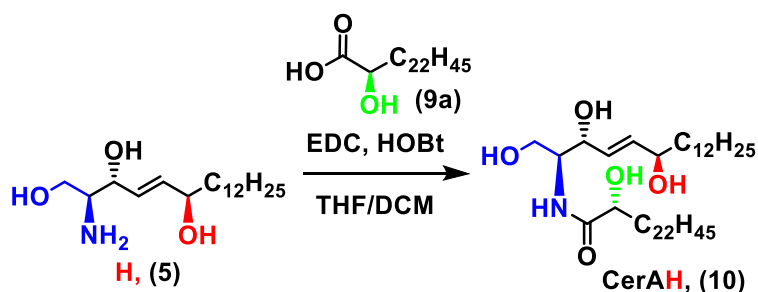


Schéma 16 Prehľad prípravy Cer AH.

3.4. Príprava (*R*)-Cerebrónovej kyseliny

Keďže v príprave Cer AH acylačnou reakciou s racemickou CA dostávame zmes diastereomerov Cer AH rozhodli sme sa oddeliť *R*-izomer CA. Týmto krokom sme sa snažili o zvýšenie výtťažnosti fyziologického diastereoméru Cer AH a taktiež zjednodušenie čistenia reakcie. Racemická CA použitá v tomto postupe bola pripravená v rámci iného projektu (jednalo sa o α -bromáciu nasledovanú reakciou s hydroxidom sodným). Na oddelenie enantiomérov sme použili enzymaticky katalizovanú separáciu podľa Sugai a Ohta pomocou Lipázy PS (Amano) a vinylacetátu (VA) pri 65 °C v prítomnosti malého množstva 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylfenolu (BHT) za vzniku (*R*)-CA a (*S*)-acetoxyCA [70]. Lipáza PS bola rozsuspendedovaná v roztoku CA, BHT, VA a THF a následne ponechaná reagovať 30 hodín pri 65 °C. Príprava (*R*)-CA je zobrazená na schéme 17.

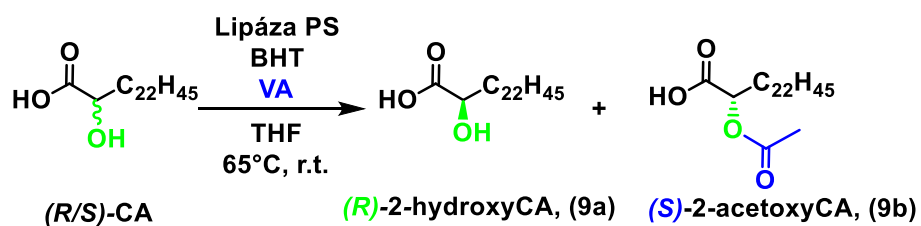


Schéma 17 Popis separácie enantiomerov CA.

Získaná zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie mobilnou fázou $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradientovou elúciou 50/1; 40/1; 25/1; 10/1. Keďže hydroxykyseliny majú vysokú retenciu aj na stĺpci bolo k mobilnej fáze pridaných pár kvapiek CH_3COOH . Týmto spôsobom sa nám podarilo oddeliť oba produkty, ktorých štruktúra bola potvrdená pomocou NMR analýzy. Výťažok požadovanej (*R*)-CA predstavoval 44 %. Takto vzniknutá (*R*)-CA bola použitá k pokusu o prípravu Cer AH.

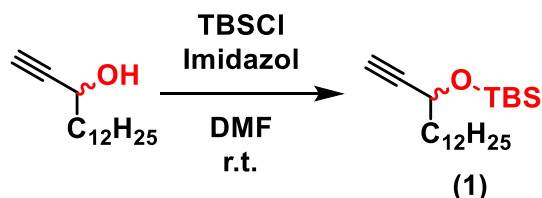
4. Experimentálna časť

4.1. Technické parametre a chemikálie

Východiskové látky, činidlá, rozpúšťadlá a ďalšie komerčne dostupné chemikálie a materiály boli zadovážené od tradičných dodávateľov: Merck, Sigma-Aldrich a PENTA. Počiatočná východisková látka využitej syntézy bola pripravená v rámci iného projektu. Takisto sukcinimidylester 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny a racemická cerebrónová kyselina boli synteticky pripravené v rámci iných projektov našej pracovnej skupiny. Na stĺpcovú chromatografiu bol využitý Silikagél 60 (230-400). Na sledovanie priebehu chemických reakcií, kontrolu čistoty produktov a charakterizáciu získaných látok bola využívaná tenkovrstevná chromatografia na hliníkových TLC doskách Silikagél 60 F254 (Merck). K detekcii vyvinutých dosiek bola používaná detekčná zmes $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, koncentrovaná kyselina sírová a voda. Na detekciu voľných amínov bola použitá detekcia roztokom Ninhydrínu. ^1H a ^{13}C NMR spektrá všetkých látok boli namerané pomocou prístrojov VARIAN VNMR S500 a JEOL JNM-ECZ 600Rv roztokoch CDCl_3 (alebo zmesi $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$). Pomocou prístroja NICOLET 6700 FT-IR s ATR sondou boli namerané IR spektrá. Na meranie optickej otáčanlivosti bol použitý prístroj Krüss optronic P3000 (Krüss GmbH).

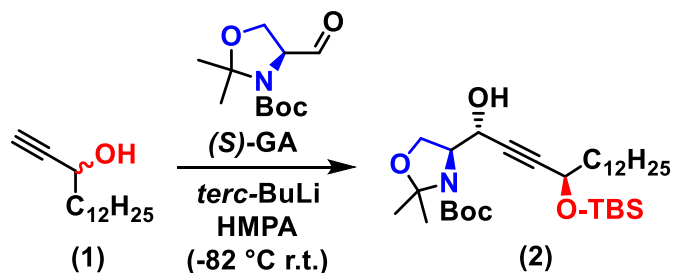
4.2. Postup prípravy

4.2.1. (R/S)-3-(*tert*-butyldimetylsilyloxy)pentadec-1-yn (1)



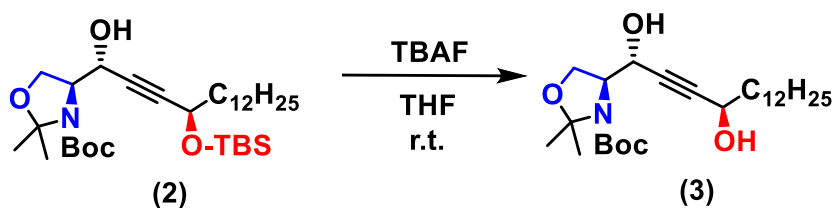
K roztoku 1,54 g alkynolu (5,720 mmol, 1,0 ekv.) a 1,12 g imidazolu (14,300 mmol, 2,5 ekv.) v bezvodom THF (20 ml) bol pridaný roztok 1,55 g *tert*-butyldimetylsilylchloridu (8,870 mmol, 1,5 ekv.) v 5 ml bezvodého THF po kvapkách v inertnej atmosfére Ar za bezvodých podmienkach pri 0°C v ľadovom kúpeli. Následne bola reakčná zmes za intenzívneho miešania ponechaná reagovať pri r.t. 6 hod. Prídavkom vody (75 ml) bola reakcia ukončená a reakčná zmes extrahovaná Et_2O (3×100 ml). Následne bola pomocou Na_2SO_4 dosušená organická fáza a rozpúšťadla odparené pod zníženým tlakom. Získaná zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéli (mobilná fáza Hexán/ EtOAc 30/1) za vzniku 2,23 g bezfarebného oleja (1) s výťažkom 99 %.

4.2.2. *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*)-4-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylát (2)



K roztoku 2,03 g (1) (5,993 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom THF (10 ml) bolo po kvapkách pridaných 7,05 ml roztoku *tert*-BuLi (1,7M v Hexáne, 11,986 mmol 2,0 ekv.) za stáleho miešania pri teplote -82°C pod inertnou atmosférou Ar v bezvodých podmienkach. Reakčná zmes bola intenzívne miešaná 2 hod a následne bol pomaly po kvapkách pridaný 2,1 ml HMPA (11,986 mmol, 2 ekv.). O 20 minút bol do reakčnej zmesi po kvapkách pridávaný roztok 2,061 g (*S*)-GA (8,989 mmol, 1,5 ekv) v bezvodom THF (4 ml). Následne bola zmes za intenzívneho miešania ponechaná reagovať za r.t. po dobu 40 hodín. Následne bola reakcia ukončená prídavkom vodného roztoku NH_4Cl (20 ml) a extrahovaná pomocou Et_2O (3×50 ml) a nasýteného roztoku NaCl (25 ml). Pomocou Na_2SO_4 bola dosušená Organická fáza a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Výsledná zmes bola prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza Hexán/EtOAc 50/1) za vzniku 1,736 g oranžového oleja (2) s celkovým výťažkom 51 %.

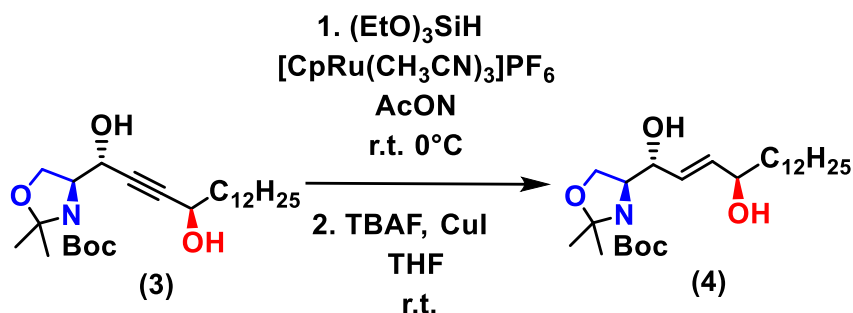
4.2.3. *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*)-1,4-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylát (3)



K roztoku 3,82 g (2) (6,69 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom THF (50 ml) bolo po kvapkách pridaných 8,5 ml roztoku TBAF (1M v Hexáne, 8,028 mmol, 1,2 ekv.) pod inertnou atmosférou Ar v bezvodých podmienkach pri 0°C v ľadovej kúpeľi. O 20 minút neskôr bola reakcia vybraná z ľadového kúpeľa a za intenzívneho miešania ponechaná reagovať ďalšie 2 hod pri r.t.. Po uplynutí reakčného času boli pod zníženým tlakom odparené rozpúšťadlá. Získaná zmes bola priamo čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (gradientová elúcia, mobilná fáza Hexán/EtOAc 5/1; 3/1; 2/1) za vzniku 3,01 g bezfarebného oleja (3) s výťažkom 99 %.

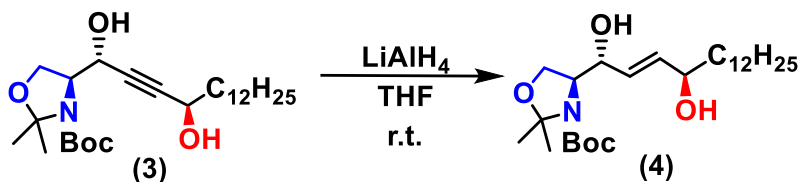
4.2.4. *tert*-butyl (*S*)-((*1R,4R,2E*)-1,4dihydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylát (4)

Postup a.)



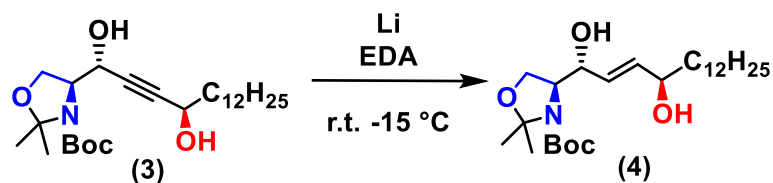
K roztoku 50 mg (**3**) (0,109 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom acetóne (1 ml) bolo pridaných 70 μl trietoxysilánu (0,330 mmol, 3,0 ekv.) v inertnej atmosfére Ar za bezvodých podmienok pri 0°C v ľadovej kúpeli. O 20 minút bolo k reakčnej zmesi pridaných 3 mg $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]\text{PF}_6$ (6,96 μmol , 0,06 ekv.) v bezvodom acetóne (1 ml). Reakčná zmes bola za intenzívneho miešania ponechaná reagovať 2 hod pri zníženej teplote. V ďalšom kroku boli odparené rozpúšťadlá pod zníženým tlakom a k zmesi bolo pridaných 5 mg CuI v bezvodom THF (1 ml). Následne bola reakčná zmes po rozpustení všetkých zložiek opäť zachladená na teplotu 0°C v ľadovom kúpeli. V ďalšom kroku bolo k zmesi po kvapkách pridávané 320 μl roztoku TBAF (1M, v Hexáne, 0,167 mmol, 1,5 ekv.) a následne bola reakcia ponechaná reagovať 16 hod pri laboratórnej teplote. Reakcia bola ukončená prídavkom vody (10 ml) a extrahovaná pomocou Et_2O (3×80 ml) s prídavkom vody (100 ml) a nasýteného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Následne bola pomocou Na_2SO_4 dosušená organická fáza a pod zníženým tlakom odparené rozpúšťadlá. Výsledná zmes bola prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza, Hexán/EtOAc 6,5/1) za vzniku 28,4 mg hnedastého oleja (**4**) (0,062 mmol) s celkovým výťažkom 56 %.

Postup b.)



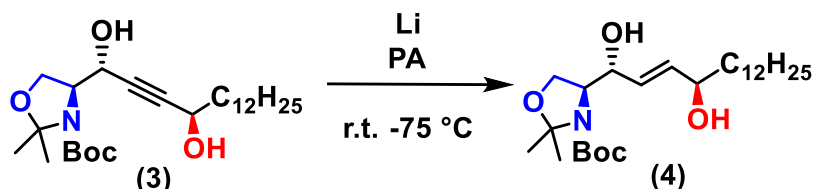
K roztoku 50 mg (**3**) (0,109 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom THF (1 ml) bolo pomaly po kvapkách pridaných 280 μl LiAlH_4 (1M, v THF, 0,667 mmol, 6,6 ekv.) v inertnej atmosfére za bezvodých podmienok pri 0°C v ľadovej kúpeli. Následne bola zmes ponechaná reagovať 5 hod. pri laboratórnej teplote za stáleho miešania. Prídavkom 10 ml vody bola reakcia ukončená a extrahovaná CHCl_3 (3×20 ml). Pomocou Na_2SO_4 bola dosušená organická fáza a pod zníženým tlakom odparené rozpúšťadlá. Výsledná zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (gradientová elúcia, mobilná fáza Hexán/EtOAc 7/1; 5/1; 3/1) za vzniku 23,6 mg hnedastého oleja (**4**) (0,052 mmol) s celkovým výťažkom 47 %.

Postup c.)



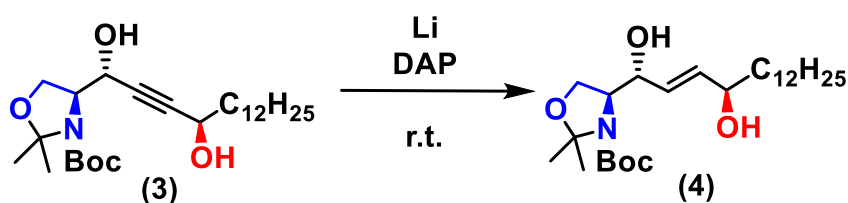
K 50 mg lítia, ktoré bolo najprv aktivované postupne v MeOH, Et₂O a Hexáne bolo pridaných 5 ml EDA v bezvodých podmienkach v inertnej atmosfére Ar. Následne po dosiahnutí teploty -15 °C bol k roztoku po kvapkách pridávaný roztok 50 mg (3) (0,110 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom THF (5 ml) a reakčná zmes bola ponechaná reagovať 1 hod pri teplote -15 °C za intenzívneho miešania. Keďže reakčná zmes zamrzla a nedošlo k vzniku elektrónového oblaku solvatovaných elektrónov bola reakcia ukončená.

Postup d.)



K 50 mg lítia, ktoré bolo najprv aktivované postupne v MeOH, Et₂O a hexáne bolo pridaných 5 ml PA v bezvodých podmienkach v inertnom prostredí Ar. Po vzniku fialovo sfarbeného komplexu bola reakčná zmes schladená na -75 °C a následne bol k reakčnej zmesi po kvapkách pridávaný roztok 50 mg (3) (0,110 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom THF (5 ml) pri teplote -75 °C. Po 1 hod došlo k zmene fialového sfarbenia na biely zákal. Po vykonaní kontrolného TLC bola reakcia ukončená s negatívnym výsledkom.

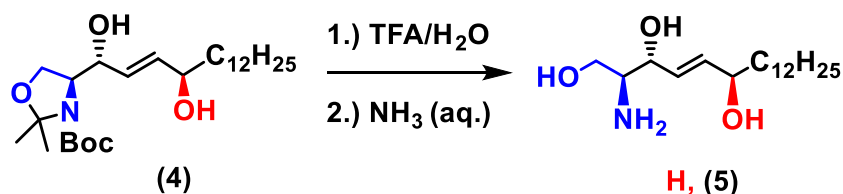
Postup e.)



K 60 mg lítia (8,800 mmol, 80 ekv.), ktoré bolo pred vlastnou reakciou aktivované postupne v MeOH, Et₂O a Hexáne bolo pridaných 0,5 ml DAP za bezvodých podmienok v inertnej atmosfére Ar pri laboratórnej teplote. Následne bol k zmesi pridávaný roztok 50 mg (3) (0,110 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom THF (0,25 ml). Reakcia bola ponechaná reagovať počas víkendy. V priebehu plynutia reakčného času došlo k zmene sfarbenia na biely zákal. Reakcia bola ukončená s neúspešným výsledkom.

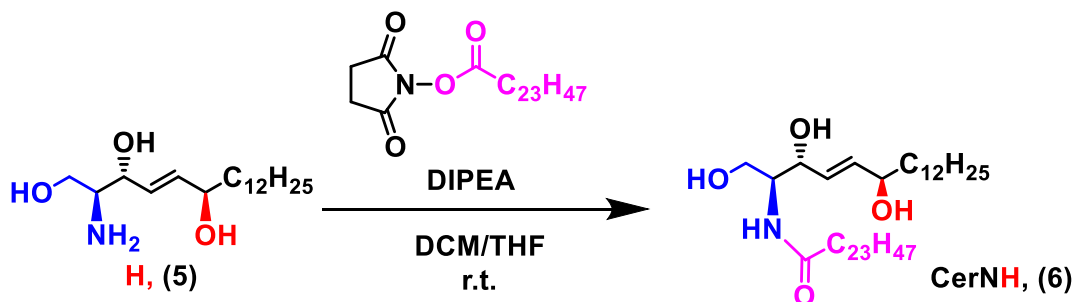
* Rovnako negatívne výsledky boli dosiahnuté pri zmene reakčnej teploty na 0 °C využitím bezvodého DAP a taktiež s prídavkom THF k bezvodému DAP.

4.2.5. (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol, H (5)



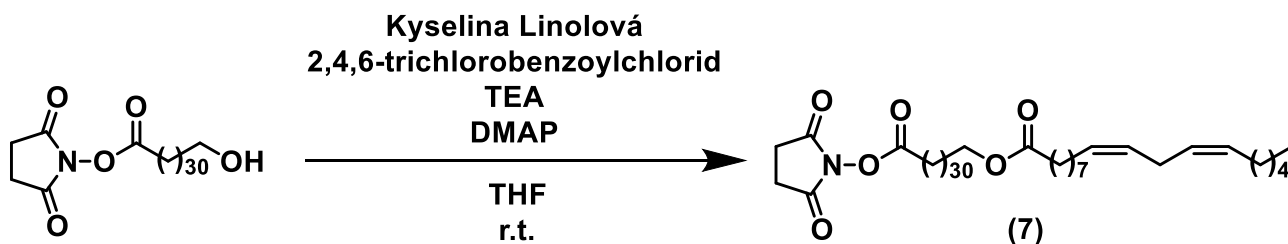
V 1 ml vody bolo rozsuspenderovaných 55 mg (4) (0,120 mmol) a za stáleho miešania bolo k suspenzii pridávaný 1,8 ml vodného roztoku TFA (3,75 eq. TFA / 1 eq. H₂O, v/v) pri 0 °C v ľadovej kúpeli. Za intenzívneho miešania bola reakčná zmes ponechaná reagovať cez noc. Následne bola reakčná zmes alkalizovaná prídavkom nasýteného vodného roztoku NH₃ na pH = 9. Výsledná suspenzia bola extrahovaná pomocou CHCl₃ (3 × 15 ml) a nasýteným roztokom NaCl (10 ml). Organická fáza bola dosušená pomocou Na₂SO₄ a pod zníženým tlakom odparené rozpúšťadlá. Výsledná zmes bola prečistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (mobilná fáza CHCl₃/MeOH/NH₃ aq. 100/6,5/1) za vzniku 28 mg (0,089 mmol) (5) bielej kryštalickej látky pozitívne reagujúcej na detekciu ninhydrínom s celkovým výťažkom 75 %.

4.2.6. (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-*N*-Tetrakosanoyl-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol, Cer NH (6)



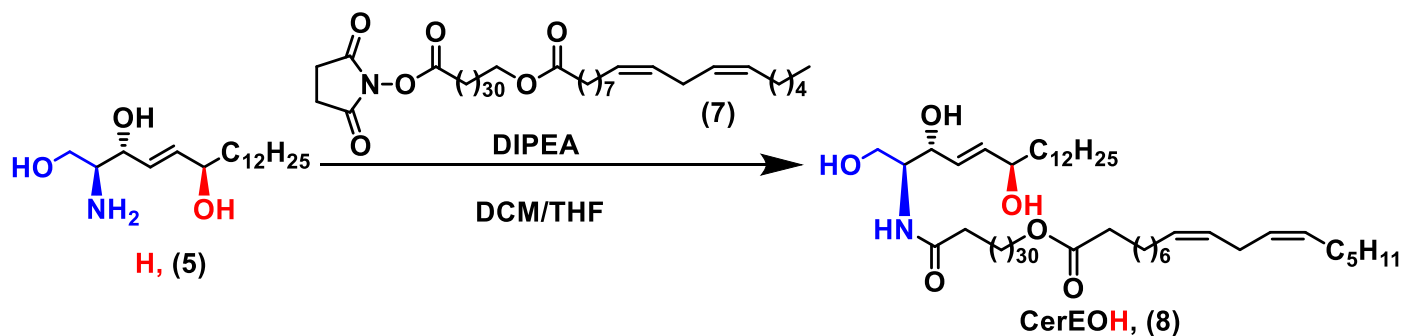
K roztoku 10 mg (5) (0,032 mmol, 1,0 ekv.) a 17,7 mg succinimidylesteru LIG (0,038 mmol, 1,2 ekv.) v bezvodom THF (1 ml) a DCM (1 ml) bolo za stáleho miešania pridávaných po kvapkách 20 µl DIPEA (0,095 mmol, 3 ekv.) pri 0 °C v ľadovej kúpeli a bezvodých podmienok v inertnej atmosfére Ar. Reakčná zmes bola za stáleho miešania ponechaná reagovať pri r.t. 30 hod. Prídaním vody (20 ml) bola reakcia ukončená a následne extrahovaná pomocou CHCl₃ (3 × 20 ml) s prídavkom nasýteného roztoku NaCl (10 ml). Následne bola pomocou Na₂SO₄ dosušená organická fáza a pod zníženým tlakom odparené rozpúšťadlá. Výsledná zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (gradientová elúcia, mobilná fáza, CHCl₃/MeOH 100/1; 60/1; 50/1; 25/1; 10/1) za vzniku 19 mg (0,029 mmol) (6) ako bielej kryštalickej látky s celkovým výťažkom 90 %.

4.2.7. Príprava Sukcínimid-1-yl 32-(linoleoyloxy) dotriakontanoátu, (7)



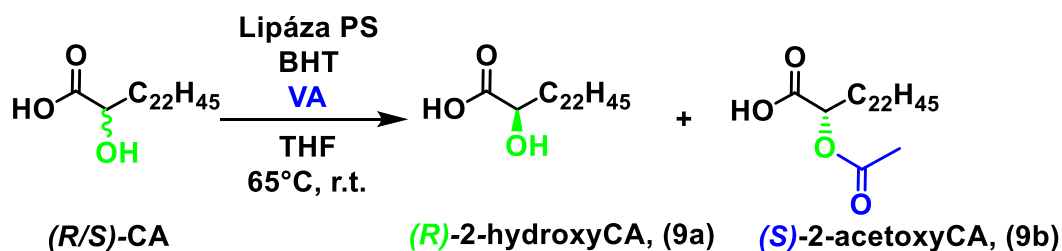
Prvým krokom v syntéze Cer EOH bola príprava prekursoru ULA (7). K 50 mg sukcinimidylesteru 32-hydroxydotriakontánovej kyseliny (0,084 mmol, 1 ekv.) bol pridaný roztok 26 mg LIN (0,093 mmol, 1,1 ekv.) v bezvodom THF (10 ml) pod inertnou atmosférou Ar za bezvodých podmienok pri laboratórnej teplote. Reakčná zmes bola zriedená bezvodým THF (10 ml) a následne bolo pridaných 25 μ l 2,4,6-trichlorobenzoyl chloridu (0,093 mmol, 1,1 ekv.) a 20 μ l TEA (0,210 mmol, 2,5 ekv.). Po 2 minútach reakcie bolo k reakčnej zmesi pridaných 6 mg DMAP (0,049 mmol, 0,6 ekv.) Po pridaní všetkých komponentov sa číra reakčná zmes zmenila na biely zákal. Reakcia bola za stáleho miešania ponechaná reagovať 40 hod. Pridaním CHCl_3 (10 ml) bola reakcia ukončená za opätovnej zmeny na číry roztok. Získaná výsledná zmes bola priamo prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 100/1) za vzniku 58 mg (0,067 mmol) ULA (7) s celkovým výtťažkom 80 %.

4.2.8. (2S,3R,4E,6R)-N-(32-linoleoyloxy-dotriakontanoyl)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol, Cer EOH (8)



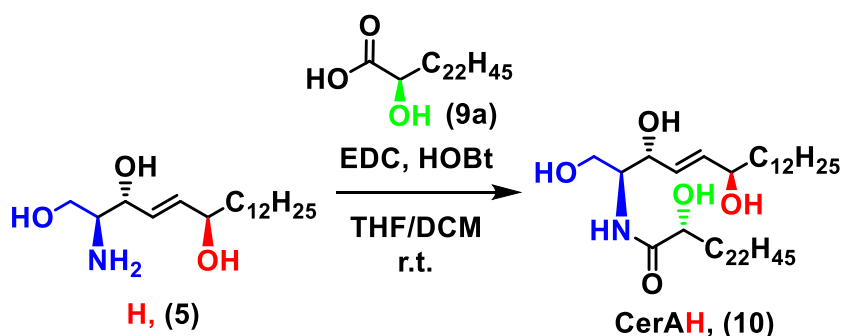
K roztoku 10 mg (5) (0,032 mmol, 1,0 ekv.) a 25 mg sukcinimidylesteru ULA (7) (0,038 mmol, 1,2 ekv.) v bezvodom THF (7,5 ml) a DCM (3,75 ml) bolo za stáleho miešania po kvapkách pridaných 20 μ l DIPEA (0,095 mmol, 3 ekv.) pri 0 °C a bezvodých podmienok v inertnej atmosfére Ar. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať za stáleho miešania pri r.t. po dobu 30 hod. Prídavkom vody (20 ml) bola reakcia ukončená a následne extrahovaná CHCl_3 (3 \times 25 ml) s prídavkom nasýteného roztoku NaCl (20 ml). Pomocou Na_2SO_4 bola dosušená organická fáza a pod zníženým tlakom odparené rozpúšťadlá. Výsledná zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (gradientová elúcia, mobilná fáza, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100/1; 75/1; 50/1; 25/1; 10/1) za vzniku 18 mg (0,018 mmol) Cer EOH (8) ako bielej kryštalickej látky s celkovým výtťažkom 54 %.

4.2.9. (*R*)-2-hydroxytetrakosanovej kyseliny, (*R*)-CA, (**9**)



Pre prípravu (*R*)-CA (**9a**) bolo 91 mg Lipázy PS (enzým na pevnom nosiči) rozsuspenderovaných v roztoku 100 mg (*R/S*)-CA (0,259 mmol, 1 ekv.), 4 mg BHT (0,182 mmol, 0,7 ekv.) a 960 μ l VA v bezvodom THF (1 ml) za stáleho miešania pri teplote 65 °C. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať 30 hod. Následne bola výsledná zmes prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie (gradientová elúcia, mobilná fáza CHCl₃/MeOH/CH₃COOH 50/1/0,1; 40/1/0,1; 25/1/0,1; 10/1/0,1) za vzniku 44 mg (*R*)-CA (**9a**) (0,114 mmol) s celkovým výťažkom 48 % a 54 mg (*S*)-2-acetoxyCA (**9b**) (0,139 mmol) s výťažkom 48 %.

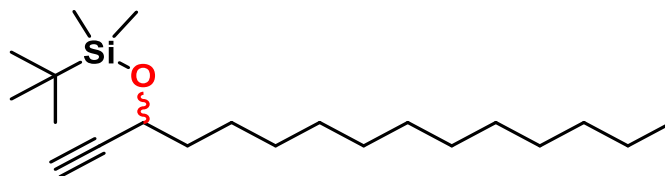
4.2.10. (*2S, 3R, 4E, 6R, 2'R*)-*N*-2'-hydroxy-Tetrakosanoyl-2-amino-oktadec-4-en-1,3,6-triol, CerAH (**10**)



K roztoku 10 mg (**5**) (0,032 mmol, 1,0 ekv.), 15 mg *R*-CA (**9a**) (0,039 mmol, 1,2 ekv.) a 17 μ l HOBt (0,126 mmol, 4,0 ekv.) v bezvodom THF (2 ml) a bezvodom DCM (1 ml) bolo za stáleho miešania pridávaných 12 μ l EDC (0,064 mmol, 2,0 ekv.) za bezvodých podmienok v inertnej atmosfére Ar pri 0 °C v ľadovej kúpeli. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať 72 hod. Po uplynutí reakčného času boli rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom a výsledná zmes bola následne priamo čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza, CHCl₃/MeOH 50/1) za vzniku 12 mg neznámeho produktu s podobnou štruktúrou ako CerAH (**10**) (0,018 mmol) s celkovým výťažkom 57 %.

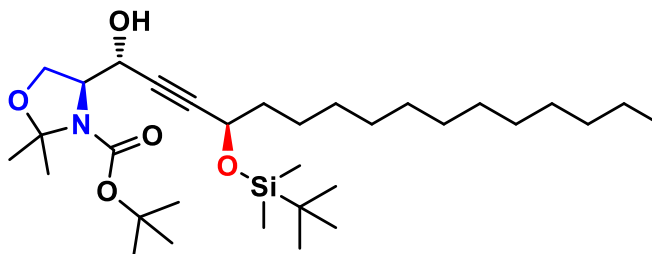
4.3. Charakterizácia látok

4.3.1. (*R/S*)-3-(*tert*-butyldimetylsilyloxy)pentadec-1-ynu (1)



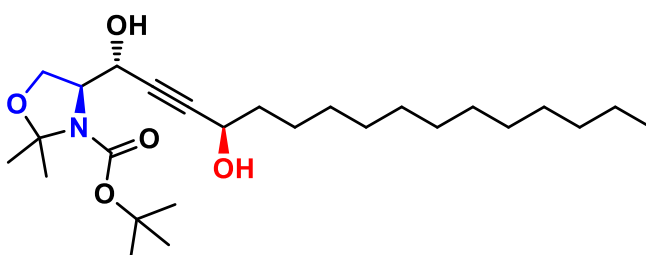
TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 10/1, $R_f = 0,40$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.34 (td, $J = 6.5, 2.1$ Hz, 1H), 2.38 (dd, $J = 2.1, 0.6$ Hz, 1H), 1.73 – 1.62 (m, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.35 – 1.19 (m, 18H), 0.98 – 0.86 (m, 12H), 0.13 (d, $J = 11.7$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 85.80, 71.81, 62.77, 38.57, 31.92, 29.67, 29.64, 29.57, 29.54, 29.35, 29.23, 25.77, 25.11, 22.69, 18.23, 14.12, -4.58, -5.08; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [10, 39, 43, 44].

4.3.2. *tert*-butyl (*S*)-4-((*1R,4R*)-4-((*tert*-butyldimetylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylátu (2)



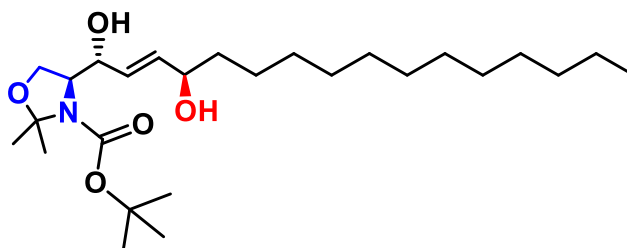
TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 5/1, $R_f = 0,50$; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4.81 – 4.54 (m, 1H), 4.34 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.18 – 3.85 (m, 3H), 1.65 – 1.57 (m, 6H), 1.51 – 1.45 (m, 12H), 1.43 – 1.31 (m, 2H), 1.32 – 0.97 (m, 18H), 0.89 – 0.83 (m, 12H), 0.12 – 0.05 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 154.04, 95.07, 88.03, 81.34, 64.98, 63.77, 62.97, 62.54, 38.72, 32.00, 29.76, 29.73, 29.68, 29.63, 29.43, 29.33, 28.48, 26.07, 25.87, 25.44, 25.30, 22.77, 18.28, 14.19, -4.35, -4.95; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [10, 39, 43, 44].

4.3.3. *tert*-butyl (*S*)-4-((*1R,4R*)-1,4-dihydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylátu (3)



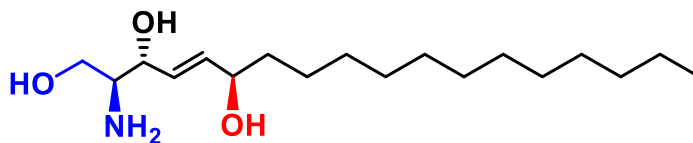
TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 2/1 $R_f = 0,50$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.59 – 4.54 (m, 1H), 4.47 – 4.31 (m, 1H), 4.23 – 4.16 (m, 1H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 4.02 – 3.79 (m, 1H), 1.80 – 1.55 (m, 4H), 1.55 – 1.36 (m, 15H), 1.36 – 1.11 (m, 18H), 1.01 – 0.79 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 154.40, 95.09, 87.21, 82.97, 81.61, 65.12, 64.25, 62.50, 62.48, 60.47, 37.77, 37.71, 32.00, 29.75, 29.73, 29.67, 29.61, 29.43, 29.36, 28.47, 26.15, 25.24, 22.77, 14.27, 14.19; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [10, 39, 43, 44].

4.3.4. *tert-butyl (S)-((1R,4R,2E)-1,4-dihydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-karboxylát (4)*



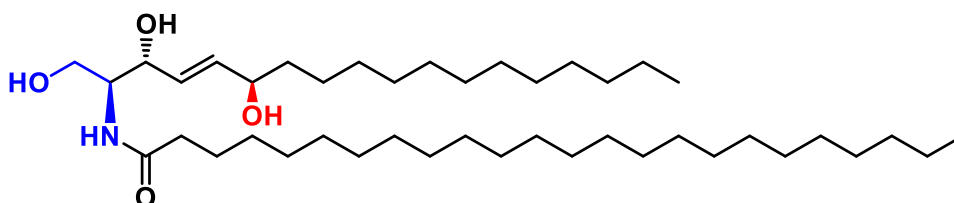
TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 1/1 $R_f = 0,65$; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.85 – 5.77 (m, 1H), 5.74 – 5.51 (m, 1H), 4.41 – 4.15 (m, 1H), 4.14 – 4.07 (m, 2H), 4.06 – 3.93 (m, 1H), 3.93 – 3.64 (m, 1H), 1.76 – 1.34 (m, 17H), 1.34 – 1.09 (m, 20H), 0.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 135.43, 135.25, 129.39, 94.61, 73.74, 72.31, 65.86, 64.94, 62.21, 60.47, 49.73, 37.35, 32.21, 32.00, 29.73, 29.66, 29.43, 28.46, 27.78, 26.49, 25.51, 24.50, 24.43, 22.76, 14.27, 14.19; **IR** ν_{max} 3399, 2923, 2853, 1685, 1671, 1467, 1385, 1366, 1255, 1172, 1102, 1070, 1049, 971, 850, 768, 721 cm^{-1} ; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [10, 39, 43, 44].

4.3.5. *(2S,3R,4E,6R)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol (5), 6-hydroxysfingozín, H*



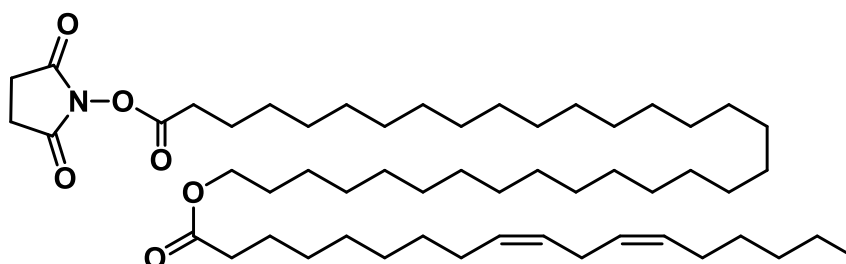
TLC: Mobilná fáza $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2/1, $R_f = 0,60$; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.81 (dd, $J = 15.8, 5.5$ Hz, 1H), 5.76 – 5.62 (m, 1H), 4.24 – 4.04 (m, 2H), 3.77 – 3.49 (m, 2H), 3.02 – 2.90 (m, 1H), 1.57 – 1.44 (m, 2H), 1.43 – 1.10 (m, 20H), 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 140.51, 133.08, 75.69, 66.29, 63.19, 60.74, 40.90, 35.85, 33.61, 33.58, 33.28, 29.46, 26.61, 17.94; **IR** ν_{max} 3355, 2918, 2850, 2357, 1664, 1528, 1464, 1392, 1367, 1286, 1251, 1170, 1096, 1054, 1023, 975, 959, 911, 875, 854, 783, 759, 721, 677, 655; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [43, 44].

4.3.6. *(2S,3R,4E,6R)-N-Tetrakosanoyl-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triolu (6), Cer NH*



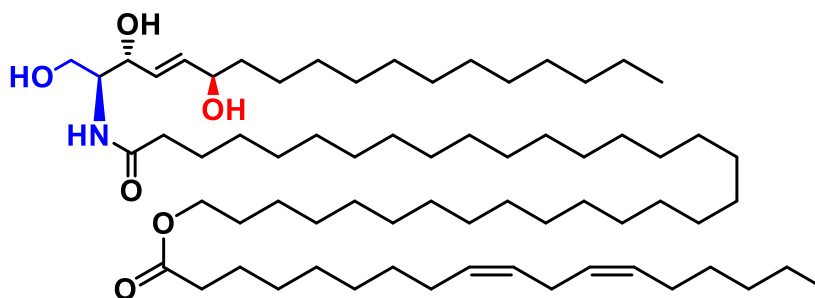
TLC: Mobilná fáza $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10/1, $R_f = 0,48$; **IR** ν_{max} 3310, 2954, 2918, 2850, 1868, 1743, 1715, 1697, 1681, 1661, 1622, 1564, 1543, 1508, 1471, 1423, 1377, 1339, 1062, 960, 874, 805, 719; **Tt** 101 – 103 $^{\circ}\text{C}$; látka bola pripravovaná len v kontexte práce, NMR spektra sa zhodovali s literatúrou. Ref. [43, 37].

4.3.7. Sukcínimid-1-yl 32-(linoleoyloxy)-dotriakontanoátu, (7)



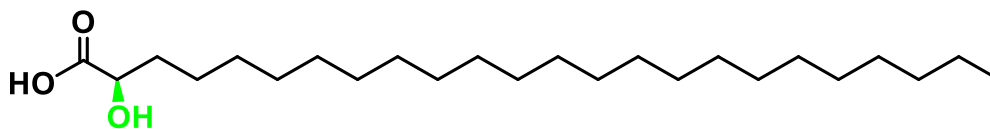
TLC: CHCl₃/MeOH 19/1, *R_f* = 0,85; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 5.44 – 5.29 (m, 4H), 4.06 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.78 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.34 – 2.26 (m, 2H), 2.10 – 2.02 (m, 4H), 1.80 – 1.70 (m, 2H), 1.67 – 1.58 (m, 6H), 1.47 – 1.18 (m, 66H), 0.93 – 0.86 (m, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 173.97, 169.15, 168.68, 130.20, 130.04, 128.02, 127.89, 125.50, 64.40, 34.39, 31.51, 30.93, 30.30, 29.70, 29.66, 29.62, 29.58, 29.55, 29.52, 29.34, 29.25, 29.16, 29.11, 29.08, 28.78, 28.64, 27.18, 25.92, 25.61, 25.58, 25.00, 24.56, 22.56, 14.06; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [64].

4.3.8. (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-*N*-(32-linoleoyloxy-dotriakontanoyl)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triolu, Cer EOH (8)



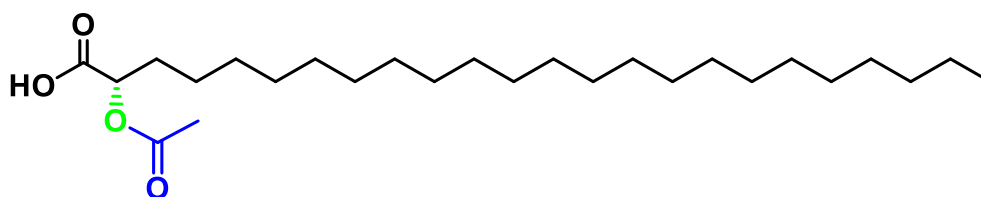
TLC: CHCl₃/MeOH 20/1, *R_f* = 0,30; **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ 6.30 (s, 1H), 5.95 – 5.68 (m, 2H), 5.44 – 5.25 (m, 4H), 4.56 – 4.30 (m, 1H), 4.23 – 4.10 (m, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.00 – 3.84 (m, 2H), 3.79 – 3.56 (m, 1H), 2.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.36 – 2.30 (m, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.25 – 2.19 (m, 2H), 2.07 – 2.01 (m, 4H), 1.73 – 1.45 (m, 12H), 1.45 – 1.03 (m, 82H), 1.01 – 0.72 (m, 6H). **¹³C NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ 173.99, 135.77, 130.28, 130.10, 129.60, 128.14, 128.01, 74.02, 72.07, 64.47, 62.32, 54.63, 54.58, 37.44, 36.89, 34.48, 31.97, 31.58, 29.75, 29.71, 29.64, 29.57, 29.49, 29.43, 29.39, 29.31, 29.19, 29.15, 28.75, 27.26, 26.00, 25.79, 25.71, 25.51, 25.08, 24.82, 22.71, 22.59, 14.10, 14.05; **IR** *v*_{max} 3310, 2917, 2849, 1738, 1713, 1622, 1548, 1471, 1421, 1377, 1277, 1250, 1174, 1139, 1119, 1090, 1028; **T_t** 86 – 90 °C; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [64].

4.3.9. (R)-2-hydroxytetrakosanovej kyseliny, (R)-CA (9a)



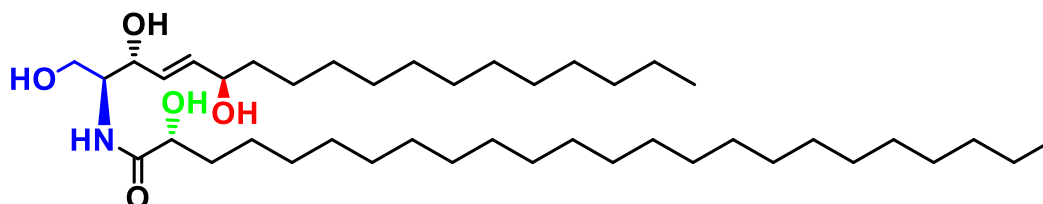
TLC: CHCl₃/MeOH 20/1, R_f = 0,48; [α]²⁵_D = +0,01 (c = 0.1, CHCl₃/MeOH, 1/1); Charakterizácia odpovedá. Ref. [37].

4.3.10. (S)-2-acetyltetrakosanovej kyseliny, (S)-2-acetoxyCA, (9b)



TLC: CHCl₃/MeOH, 20/1, R_f = 0,70; Charakterizácia odpovedá literatúre. Ref. [37].

4.3.11. (2S,3R,4E,6R,2'R)-N-2'-hydroxy-Tetrakosanoyl-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol, Cer AH (10)



TLC: (CHCl₃/MeOH, 10/1) R_f = 0,40; ¹NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.01 – 6.69 (m, 1H), 5.81 – 5.70 (m, 2H), 4.46 – 4.24 (m, 1H), 4.25 – 4.02 (m, 1H), 4.03 – 3.85 (m, 2H), 3.81 – 3.61 (m, 1H), 2.14 – 1.87 (m, 4H), 1.73 – 0.98 (m, 62H), 0.98 – 0.70 (m, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 172.07, 135.77, 129.25, 126.58, 126.46, 117.06, 111.41, 73.46, 71.97, 61.87, 54.89, 37.22, 37.19, 32.84, 32.01, 30.12, 29.78, 29.74, 29.69, 29.64, 29.44, 27.17, 25.57, 23.30, 22.77, 19.81, 14.20, 1.10; IR ν_{max} 3421, 3285, 2953, 2923, 2851, 1731, 1630, 1544, 1508, 1469, 1397, 1378, 1145, 1092; T_f 85 – 91 °C; Ref. [37].

*Na základe nameraných NMR a IR spektier nie sme schopní jednoznačne potvrdiť, že sa jedná o CerAH. Porovnaním hodnôt z literatúry v spektrách chýbajú niektoré kľúčové signály, ktoré by potvrdili štruktúru CerAH.

5. Záver

Ceramidy radíme do skupiny sfingolipidov, ktoré zohrávajú podstatnú rolu v rámci intracelulárnych a extracelulárnych funkcií všetkých eukaryotických buniek. Spoločne s voľnými masnými kyselinami, cholesterolom a cholesterol-sulfátom vytvárajú intercelulárny lipidový matrix zabezpečujúci bariérové vlastnosti kože. Dnes poznáme viac ako 12 podskupín ceramidov. Orgánom, v ktorom môžeme pozorovať najväčšiu rozmanitosť a obsah ceramidov je koža. Podstata tohto rozličného zastúpenia práve v koži stále nebola plne objasnená a je predmetom výskumu dodnes.

Na rozdiel od ceramidov odvodených od sfingozínu, dihydrosfingozínu a fyto-sfingozínu sa ceramidy odvodené od 6-hydroxysfingozínu vyskytujú výhradne v ľudskej epidermis. Štúdium tejto pomerne mladej skupiny 6-hydroxyceramidov je náročné hlavne z dôvodu ich komerčnej nedostupnosti a komplikovanej mnohokrokovej syntézy. Práve preto bola našim cieľom optimalizácia vedúca k upscalingu jednotlivých reakcií vopred navrhutej syntetickej dráhy vedúcej k zisku 6-sfingozínu. Keďže sa jedná o chirálne aktívne látky, našim hlavným zámerom bolo zvýšiť stereoselektivitu navrhnutého syntetického postupu. Zamerali sme sa na dva najťažšie a zároveň kľúčové kroky danej syntézy. Prvým krokom bola alkynylácia (*S*)-Garnerovho aldehydu dopredupripraveným chráneným racemickým alkynolom, čo predstavuje hlavný krok syntézy tvoriaci polárnu hlavu molekuly. Druhý podstatný krok v syntéze 6-hydroxysfingozínu, ktorého optimalizácii sme sa venovali bola selektívna redukcia trojitej väzby na *trans*-dvojitú väzbu. *Trans*-selektívne redukcie vo všeobecnosti predstavujú problém v rámci organickej syntézy a preto sme tomuto kroku venovali zvlášť veľkú obozretnosť a pozornosť. Taktiež sme sa venovali optimalizácii čistenia a zisku požadovaných produktov v rámci tohto postupu. Celá syntéza vedúca k zisku 6-hydroxysfingozínu pozostávala zo 7 krokov, z ktorých 5 bolo náplňou tejto práce. Celkový výťažok činil 21 % a prvé kroky boli optimalizované pre prácu s niekoľkogramovým množstvom východiskovej látky. V priebehu prípravy sme sa stretli s viacerými problémami, ako napríklad racemizácia produktov alebo náročná izolácia požadovaných diastereomerov, ktoré sú zodpovedné za nízku výťažnosť syntézy. Podarilo sa nám však z experimentálne získaných výsledkov určiť najvhodnejší typ redukcie pre náš substrát, ktorým je redukcia za využitia LiAlH_4 , ktorej výťažnosť, jednoduchosť prevedenia a schopnosť udávať výťažky v úzkom rozpätí sa javí ako veľká výhoda oproti zložitým viackrokovým postupom.

Ďalším cieľom bola príprava všetkých známych podtypov 6-hydroxyceramidov zo sfingoidnej bázy získanej týmto spôsobom. Táto práca zahŕňa prípravu troch 6-hydroxyceramidov. Cer NH bol získaný s celkovým výťažkom 90 %. V príprave Cer EOH sme sa snažili zvýšiť výťažnosť využitím prekurzoru daného acylového reťazca. Celková výťažnosť Cer EOH činila 54 %. Na prípravu Cer AH s celkovým výťažkom 57 % bola oproti pôvodnému postupu využitá reakcia s chirálne čistou (*R*)-cerebrónovou kyselinou. Avšak porovnaním hodnôt spektier s literatúrou štruktúra Cer AH nebola jednoznačne potvrdená.

Väčšina vopred vytýčených cieľov bola splnená, vrátane optimalizácie alkynylácie (*S*)-GA, upscalingu jednotlivých reakcií na jednotky gramov alebo zistenia najvhodnejšieho spôsobu redukcie trojitej väzby na *trans*-dvojitú nášho substrátu s využitím LiAlH₄. Taktiež sa nám podarilo optimalizovať separáciu výsledných zmesí jednotlivých reakcií za vzniku chirálne čistého a stabilného produktu vo väčšej miere ako v predošlých postupoch.

Naša práca obsahuje experimentálne získané dáta, ktoré môžu v budúcnosti slúžiť pri riešení niektorých problémov týkajúcich sa kompletnej syntézy fyziologických 6-hydroxyceramidov, prípadne ich derivátov. Súčasne všetky pripravené látky budú v budúcnosti slúžiť pre štúdium významu a funkcií týchto epidermálnych lipidov v ľudskom organizme.

6. Zoznam skratiek

- AD** atopická dermatitída
- AgOTf** trifluormetánsulfonát strieborný
- BHT** 2,6-bis(1,1-dimetyletyl)-4-metylfenol
- BOC** *tert*-butyloxykarbonyl
- Terc*-BuLi** *tert*-butyllítium
- CA** cerebrónová kyselina
- CE** korneocytálna obálka
- Cer** ceramid(y)
- CLE** korneocytálna lipidová obálka
- DAP** 1,3-diaminopropán
- DCM** dichlórmetán
- DIBAL** diisobutylaluminium hydrid
- DIPEA** diisopropyletylamín
- DMAP** dimetylamínopyridín
- DMF** dimetylformamid
- EDA** etyléndiamín
- EDC** 1-etyl-3(3-dimetylamínopropyl)karbodiimid
- Et₂O** dietyléter
- FFA** voľné mastné kyseliny
- GlcCer** glukosylované ceramidy
- H** 6-hydroxysfingoín
- H-Cer** 6-hydroxyceramidy
- HOBt** 1-hydroxybenzotriazol
- HMPA** hexametylfosforamid
- Chol** cholesterol
- CholS** cholesterol sulfát
- IR** infračervená spektroskopia
- LIG** lignocerová kyselina

LIN linolová kyselina

NMR nukleárna magnetická rezonancia

P fytosfingozín

PA propylamín

***p*-TsOH** *p*-toluensulfonová kyselina

Ref. referencie

R_f retenčný faktor

r.t. laboratórna teplota

S sfingozín

dS dihydrosfingozín

SC stratum corneum

(S)-GA Garnerov aldehyd, (*S*)-*terc*-butyl-4-formyl-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylát

SL sfingolipid(y)

SM sfingomyelín

TBAF tetra-*n*-butylamonium fluorid

TBSCI *terc*-butyldimetylsilyl-chlorid

TEA trietylamín

TFA trifluoroctová kyselina

THF tetrahydrofurán

TLC tenkovrstvová chromatografia

TMS trimetylsilyl

T_t teplota topenia

VA vinylacetát

ULA ultra dlhý acylový reťazec

7. Použitá literatura

1. Akiyama, M., *Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis*. Journal of dermatological science, 2017. **88**(1): p. 3-9.
2. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(2): p. 139-150.
3. Hannun, Y.A., *Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress*. Science, 1996. **274**(5294): p. 1855-1859.
4. Holleran, W.M., Y. Takagi, and Y. Uchida, *Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders*. FEBS letters, 2006. **580**(23): p. 5456-5466.
5. Rabionet, M., K. Gorgas, and R. Sandhoff, *Ceramide synthesis in the epidermis*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 422-34.
6. Van Smeden, J. and J.A. Bouwstra, *Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients*. Skin barrier function, 2016. **49**: p. 8-26.
7. Hamanaka, S., et al., *Sphingoglycolipids in human cultured keratinocytes*. Arch Dermatol Res, 1990. **282**(5): p. 345-7.
8. Motta, S., et al., *Ceramide composition of the psoriatic scale*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1182**(2): p. 147-51.
9. Majcher, A., *Syntéza a hodnotenie ľudských 6-hydroxyceramidov*. Diplomová práce, 2020.
10. Kováčik, A., et al., *Synthesis of 6-hydroxyceramide using ruthenium-catalyzed hydrosilylation–protodesilylation. Unexpected formation of a long periodicity lamellar phase in skin lipid membranes*. RSC advances, 2016. **6**(77): p. 73343-73350.
11. Čihák, R., *Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání*. 2016, Praha: Grada.
12. Elias, P.M. and K.R. Feingold, *Skin barrier*. 2005: CRC Press.
13. Mescher, A.L., *Junqueirovy základy histologie*. 2018: Galén.
14. Arda, O., N. Göksügür, and Y. Tüzün, *Basic histological structure and functions of facial skin*. Clinics in dermatology, 2014. **32**(1): p. 3-13.
15. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. European journal of dermatology, 2002. **12**(4): p. 390-401.
16. Wysocki, A.B., *Skin anatomy, physiology, and pathophysiology*. The Nursing Clinics of North America, 1999. **34**(4): p. 777-97, v.
17. Štork, J., *Dermatovenerologie*. 2013: Galén.
18. Matsui, T. and M. Amagai, *Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum*. International immunology, 2015. **27**(6): p. 269-280.
19. Záhejský, J., *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. 2006: Grada Publishing as.
20. Elias, P.M., et al., *Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE)*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014. **1841**(3): p. 314-318.
21. Nemes, Z. and P.M. Steinert, *Bricks and mortar of the epidermal barrier*. Experimental & molecular medicine, 1999. **31**(1): p. 5-19.
22. Takeichi, T., et al., *SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation*. J Clin Invest, 2020. **130**(2): p. 890-903.
23. Olsen, A.S. and N.J. Færgeman, *Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases*. Open biology, 2017. **7**(5): p. 170069.
24. Coderch, L., et al., *Ceramides and skin function*. American journal of clinical dermatology, 2003. **4**(2): p. 107-129.
25. Kihara, A., *Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides*. Progress in lipid research, 2016. **63**: p. 50-69.

26. Yamamoto, H., et al., *Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene FATP4 through formation of the barrier lipid ω -O-acylceramide*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. **117**(6): p. 2914-2922.
27. Rabionet, M., et al., *1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis [S]*. Journal of lipid research, 2013. **54**(12): p. 3312-3321.
28. Suzuki, M., Y. Ohno, and A. Kihara, *Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases*. J Lipid Res, 2022. **63**(7): p. 100235.
29. Opálka, L., et al., *Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides*. Org Lett, 2015. **17**(21): p. 5456-9.
30. Liebisch, G., et al., *Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures*. J Lipid Res, 2020. **61**(12): p. 1539-1555.
31. Lowther, J., et al., *Structural, mechanistic and regulatory studies of serine palmitoyltransferase*. Biochemical Society Transactions, 2012. **40**(3): p. 547-554.
32. Harrison, P.J., T.M. Dunn, and D.J. Campopiano, *Sphingolipid biosynthesis in man and microbes*. Natural product reports, 2018. **35**(9): p. 921-954.
33. Mullen, T.D., Y.A. Hannun, and L.M. Obeid, *Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology*. Biochemical Journal, 2012. **441**(3): p. 789-802.
34. Kováčik, A., J. Roh, and K. Vávrová, *The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family*. Chembiochem, 2014. **15**(11): p. 1555-62.
35. Wakita, H., K. Nishimura, and M. Takigawa, *Composition of free long-chain (sphingoid) bases in stratum corneum of normal and pathologic human skin conditions*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(5): p. 617-22.
36. Robson, K.J., et al., *6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides*. J Lipid Res, 1994. **35**(11): p. 2060-8.
37. Stewart, M.E. and D.T. Downing, *A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin*. J Lipid Res, 1999. **40**(8): p. 1434-9.
38. Bleck, O., et al., *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): p. 894-900.
39. Masuda, Y. and K. Mori, *Synthesis and Absolute Configuration of 6-Hydroxylated New Ceramides in Human Skin, Ceramides B, 4, 7 and 8*. 2005, Wiley Online Library.
40. Mori, K. and Y. Masuda, *Synthesis and stereochemistry of ceramide B,(2S, 3R, 4E, 6R)-N-(30-hydroxytriacontanoyl)-6-hydroxy-4-sphingenine, a new ceramide in human epidermis*. Tetrahedron letters, 2003. **44**(51): p. 9197-9200.
41. Wisse, P., et al., *Synthesis of 6-Hydroxysphingosine and α -Hydroxy Ceramide Using a Cross-Metathesis Strategy*. J Org Chem, 2015. **80**(14): p. 7258-65.
42. Liew, S.K., S.J. Kaldas, and A.K. Yudin, *A Linchpin Synthesis of 6-Hydroxyceramides from Aziridine Aldehydes*. Org Lett, 2016. **18**(24): p. 6268-6271.
43. Yadav, J., et al., *The first total synthesis of the 6-hydroxy-4E-sphingenines*. Tetrahedron letters, 2003. **44**(14): p. 2983-2985.
44. Chun, J., H.-S. Byun, and R. Bittman, *First asymmetric synthesis of 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramides. Use of chiral propargylic alcohols to prepare a lipid found in human skin*. The Journal of Organic Chemistry, 2003. **68**(2): p. 348-354.
45. Zimmerman, H.E., *Orientation in metal ammonia reductions*. Tetrahedron, 1961. **16**(1-4): p. 169-176.
46. Rossi, R., *Insect pheromones; I. Synthesis of achiral components of insect pheromones*. Synthesis, 1977. **1977**(12): p. 817-836.
47. Benkeser, R.A., G. Schroll, and D.M. Sauve, *Reduction of organic compounds by lithium in low molecular weight amines. II. Stereochemistry. Chemical reduction of an isolated non-terminal double bond*. Journal of the American Chemical Society, 1955. **77**(12): p. 3378-3379.
48. REGGEL, L., R.A. Friedel, and I. WENDER, *Lithium in Ethylenediamine: A New Reducing System for Organic Compounds1*. The Journal of Organic Chemistry, 1957. **22**(8): p. 891-894.

49. Ková ová, I. and L. Streinz, *Preparation of E-alkenes using lithium and 1, 3-diaminopropane*. Synthetic communications, 1993. **23**(17): p. 2397-2404.
50. Slauch, L., *Lithium aluminum hydride, a homogeneous hydrogenation catalyst*. Tetrahedron, 1966. **22**(6): p. 1741-1746.
51. House, H.O., *Modern synthetic reactions*. 1972.
52. Svoboda, J., *Organická syntéza I*. 2000: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
53. Grant, B. and C. Djerassi, *Mechanism of hydride reduction of 1-alkyn-3-ols*. The Journal of Organic Chemistry, 1974. **39**(7): p. 968-970.
54. Eisch, J.J. and W.C. Kaska, *A Novel Carbon-Carbon Bond Scission and the Isomerization Mechanism of Vinylaluminum Compounds*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2165-2166.
55. Eisch, J.J. and M.W. Foxton, *Organometallic compounds of Group III. XIX. Regiospecificity and stereochemistry in the hydralumination of unsymmetrical acetylenes. Controlled cis or trans reduction of 1-alkynyl derivatives*. The Journal of Organic Chemistry, 1971. **36**(23): p. 3520-3526.
56. Trost, B.M. and Z.T. Ball, *Alkyne hydrosilylation catalyzed by a cationic ruthenium complex: efficient and general trans addition*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(50): p. 17644-55.
57. Trost, B.M., Z.T. Ball, and T. Jöge, *A chemoselective reduction of alkynes to (E)-alkenes*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(27): p. 7922-3.
58. Radkowski, K., B. Sundararaju, and A. Fürstner, *A functional-group-tolerant catalytic trans hydrogenation of alkynes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(1): p. 355-60.
59. Kusy, R., et al., *Ligand-to-metal ratio controls stereoselectivity: Highly functional group-tolerant, iridium-based, (E)-selective alkyne transfer semihydrogenation*. Chem Catalysis, 2022.
60. Choi, M.J. and H.I. Maibach, *Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin*. American journal of clinical dermatology, 2005. **6**(4): p. 215-223.
61. Van Smeden, J., et al., *The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014. **1841**(3): p. 295-313.
62. Schreiner, V., et al., *Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging*. Journal of investigative dermatology, 2000. **114**(4): p. 654-660.
63. Janssens, M., et al., *Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema*. Journal of investigative dermatology, 2011. **131**(10): p. 2136-2138.
64. Janssens, M., et al., *Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients [S]*. Journal of lipid research, 2012. **53**(12): p. 2755-2766.
65. Sikorski, W.H. and H.J. Reich, *The regioselectivity of addition of organolithium reagents to enones and enals: the role of HMPA*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(27): p. 6527-35.
66. Reetz, M.T., M. Hüllmann, and T. Seitz, *The First Direct Evidence for a Cram Chelate*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1987. **26**(5): p. 477-479.
67. Houk, K., *Perspective on "Theoretical interpretation of 1-2 asymmetric induction. The importance of antiperiplanarity"*. Theoretical Chemistry Accounts, 2000. **103**(3): p. 330-331.
68. Dhimitruka, I. and J. SantaLucia, *Investigation of the Yamaguchi esterification mechanism. Synthesis of a Lux-S enzyme inhibitor using an improved esterification method*. Organic letters, 2006. **8**(1): p. 47-50.
69. Opálka, L.s., et al., *Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides*. Organic Letters, 2015. **17**(21): p. 5456-5459.
70. Sugai, T. and H. Ohta, *Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-hydroxyhexadecanoic acid and its esters*. Agricultural and biological chemistry, 1990. **54**(12): p. 3337-3338.