UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

Syntéza polyenových fluorescenčních ceramidů

Diplomová práce

Filip Škarda

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

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

Filip Škarda

V Hradci Králové 2014

Poděkování:

Tímto bych velmi rád poděkoval vedoucí práce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za její ochotu, cenné rady a pomoc při vypracovávání této závěrečné práce. Dále bych rád poděkoval kolegům z laboratoře a ostatním pracovníkům katedry.

Obsah

ABSTRAKT **5**

ABSTRACT **6**

1. CÍL PRÁCE **7**

2. TEORETICKÁ ČÁST **8**

2.1. ROLE CERAMIDŮ V BUNĚČNÉ SIGNALIZACI A APOPTÓZE 8
2.2. VÝZNAM CERAMIDŮ V KŮŽI, ROHOVÁ VRSTVA KŮŽE 9
2.3. STRUKTURA CERAMIDŮ, CERAMIDY LIPIDOVÉ MATRIX 9
2.4. ROZDÍLY ZASTOUPENÍ LIPIDŮ V ZDRAVÉ A POŠKOZENÉ KŮŽI 11
2.5. VLIV EXOGENNÍCH CERAMIDŮ NA REGENERACI KOŽNÍ BARIÉRY 11
2.6. FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ LIPIDY 12
2.7. FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ CERAMIDY A JEJICH ANALOGA VE STUDIU KOŽNÍ BARIÉRY 12
2.8. FLUORESCENČNÍ POLYENOVÉ ZNAČKY 13
2.9. GRUBBSOVY METATEZE = METATEZE OLEFINŮ 15
2.10. KATALYZÁTORY POUŽÍVANÉ PŘI METATEZÍCH 16
2.11. MECHANISMUS METATEZE 16
2.12. PŘÍKLADY VYUŽITÍ METATEZE V SYNTÉZE LIPIDŮ 16

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **19**

3.1. CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE 19
3.2. SYNTÉZA 19
3.2.1. SYNTÉZA 1 20
3.2.1.1. Příprava terc-butyl(S)-4-((R)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (3) *22*
3.2.1.2. Příprava (2S,3R)-2-aminopent-4-en-1,3-diolu (4) *22*
3.2.2. SYNTÉZA 2 24
3.2.2.1 Příprava terc-butyl(4S)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (6) *25*
3.2.2.2. Příprava terc-butyl(4S)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (7) *25*
3.2.4. SYNTÉZA 3 27
3.2.4.1 Příprava N-((2S,3R,4E)-8-bromo-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)stearamidu (10) *28*
3.2.4. SYNTÉZA 4 30
3.2.4.1. Příprava ((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)trifenylfosfonium-bromidu (13) *31*
3.2.4.2. Příprava (2E,4E,6E)-okta-2,4,6-trienalu (17) *31*
3.2.4.3. Příprava (2E,4E,6E,8E)-deka-2,4,6,8-tetraenalu (19) *32*

4. VÝSLEDKY A DISKUZE **34**

4.1. SYNTÉZA 1 34
4.2. SYNTÉZA 2 34
4.3. SYNTÉZA 3 35
4.4. SYNTÉZA 4 36

5. ZÁVĚR **37**

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **38**

Abstrakt

Filip Škarda
Syntéza polyenových fluorescenčních ceramidů
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové
2014

Ceramidy jsou sloučeniny patřící mezi lipidy, přesněji sfingolipidy. Tato skupina lipidů hraje velmi významnou roli při mnoha biologických pochodech. Ceramidy se účastní v roli druhého posla programové buněčné smrti a dalších metabolických pochodů v buňce, jsou součástí biochemických dějů při tvorbě sfingomyelinu a velmi zásadní roli hrají jako součást lipidové matrix rohové vrstvy kůže při bariérové funkci epidermis.

Ukázalo se, že ceramidy ovlivňují nebo jsou ovlivňovány různými kožními onemocněními, při atopické dermatitidě pozorujeme výrazný úbytek ceramidů v kůži. Není však jisté, jestli se jedná o příčinu nebo následek onemocnění. Projevy onemocnění jako je psoriáza nebo atopická dermatitida zlepšují topicky podávané ceramidy. Ty napomáhají k regeneraci lipidové vrstvy kožní bariéry a zabraňují tak dalšímu vysušování pokožky a zhoršení nemoci.

Mechanismus jakým tyto topicky podávané ceramidy fungují, není však zcela objasněn. Právě proto je zapotřebí najít správnou metodiku, která by tento mechanismus objasnila a pomohla tak k lepšímu pochopení a léčbě kožních onemocnění.

Jednou z možností je vizualizace mechanismu zavedením fluoroforu do molekuly ceramidu. Již se používají různé metody fluorescenčního značení ceramidů (NBD, Bodipy, Rhodamin), ale ty díky své objemnosti ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti a tedy i transport a metabolismus těchto lipidů.

Jako výhodné fluorofory se ukázaly polyenové sloučeniny obsahující systém konjugovaných *trans*-dvojných vazeb v řetězci. Tento kopíruje strukturu i vlastnosti přirozených ceramidů a zobrazovací metody jsou poté více věrohodné.

Cílem této práce bylo prozkoumat syntetické přístupy k takovému ceramidu s navázaným polyenovým fluoroforem, konkrétně s řetězcem obsahujícím 5 *trans*-dvojných vazeb. K přípravě klíčového meziproduktu s terminálním halogenem ve sfingosinovém řetězci byly vyzkoušeny tři syntetické cesty. První dvě byly založené na vinylaci a alkynylaci Garnerova aldehydu, ztroskotaly však na nízké výtěžnosti vinylace spolu s nesnadnou izolací pětiuhlíkatého sfingosinu, ve druhém případě na redukci trojné vazby na *trans*-dvojnou vazbu. Třetí cesta úspěšně využila komerčně dostupný ceramid a Grubbsovu metatezi.

U všech tří cest jsme zamýšleli polyenový fluorofor napojit Wittigovou reakcí pomocí *(2E,4E,6E,8E)*-deka-2,4,6,8-tetraenalu. Aldehyd byl připraven několika krokovou syntézou, která je popsána jako čtvrtá syntetická cesta této práce.

Tyto syntetické postupy budou v budoucnu využity k přípravě cílové struktury – fluorescenčního polyenového ceramidu

Abstract

Filip Škarda
Synthesis of fluorescent polyene ceramides
Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
2014

Ceramides are lipid compounds that belong to the sphingolipid family. These molecules play a crucial role in many biological processes e.g. they are secondary messengers during apoptosis and other cellular signaling pathways, are involved in the synthesis of sphingomyelin and play very important role in the lipid matrix of stratum corneum, which is the epidermal barrier.

Recent results showed that ceramides are affecting, or are being affected by various skin diseases. In the case of atopic dermatitis, a major decrease of ceramides in the stratum corneum is observed. On the other hand, the manifestation of psoriasis or atopic dermatitis can be reduced with topically administered ceramides. The topical ceramides repair the skin lipid barrier and prevent further water loss and aggravation of the disease.

The mechanism of action of topically administered ceramides has not been fully elucidated yet. This is one of the reasons why the selection of the right methodology in order to clarify the mechanism of action is crucial.

One of the possibilities is the introduction of a fluorophore into the ceramide molecule. Currently, various fluorophores (NBD, Bodipy, Rhodamine) are used but because of their bulkiness they can undesirably affect the physicochemical properties of such lipids and, consequently, their transport and metabolism.

As the most convenient fluorophores, molecules with conjugated *trans*-double bond system are used. This moiety mimics the structural and physicochemical properties of naturally occurring ceramides; thus the imaging methods based on these substances are more accurate.

The aim of this work is to explore synthetic routes towards polyene-fluorophore-bearing ceramide, in particular containing 5 *trans*-double bonds. For the synthesis of the key intermediate with terminal halogen in the sphingosine chain, were tried three synthetic pathways. Two of them were based on vinylation and alkylation of Garner aldehyde, and unfortunately failed because of low yields and difficult isolation of 5C sphingosine analog in the first case and because of the difficulty in the reduction of the triple bond in the the second approach. The third approach successfully used the Grubbs metathesis on a commercially available ceramide.

The polyene fluorophore (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deca-2,4,6,8-tetraenal was meant to be attached to the sphingosine residue by Wittig reaction. This aldehyde was synthesized in a multistep synthesis which is described as the fourth synthetic pathway of this work.

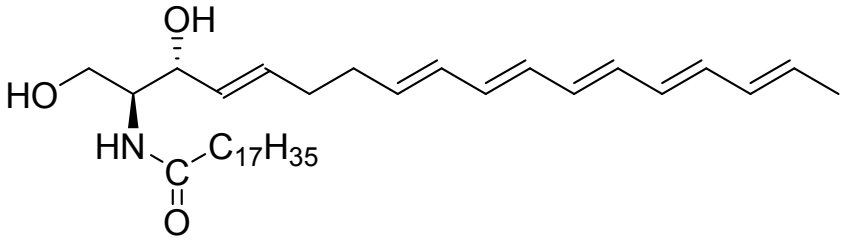
All the synthetic routes will be used in the future for the synthesis of the key compound - polyene fluorophore-bearing ceramide.

1. Cíl práce

Polyenové flurofory jsou pro značení lipidů, v našem případě ceramidů, velice výhodné především díky svým schopnostem velice dobře kopírovat vlastnosti ceramidů přirozených.

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat syntetické přístupy k polyenovému ceramidu (**obrázek 1**), který by byl dále využit pro pozorování mechanismu prostupu topicky podaných ceramidů přes lipidovou matrix rohové vrstvy pokožky.

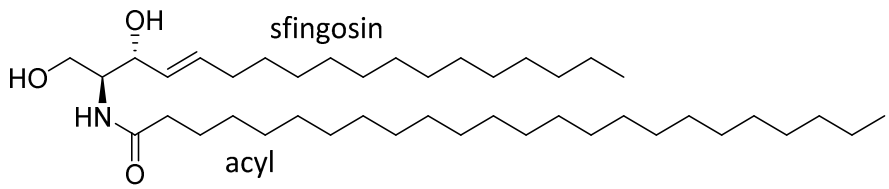
Konkrétním cílem bylo připravit polyenový fluorofor nesoucí systém pěti konjugovaných *trans*- dvojných vazeb a analog ceramidu s terminálním halogenem, který by byl dále využitelný pro přípravu fosfoniové soli a následné Wittigovy reakce.



***Obrázek 1**: Ceramid nesoucí polyenový fluorofor*

2. Teoretická část

Ceramidy, chemicky *N*-acylsfingosiny (**Obrázek 2**), patří do rodiny vysoce hydrofobních sfingolipidů a hrají velmi důležitou roli při mnoha fyziologických a metabolických pochodech. Hlavní rozdíl mezi jednotlivými druhy ceramidů tvoří ve velké většině případů buď délka acylového řetězce, který se pohybuje v rozmezí 2 až 34 uhlíků, anebo povaha sfingoidní báze. Role ceramidů v organismu spočívá především v regulaci buněčné homeostázy, jsou klíčovými intermediáty biosyntetických cest při tvorbě sfingomyelinu a také slouží jako molekuly přenášející signál pro buněčnou smrt – apoptózu. Jako druzí poslové působí ceramidy nejen pro apoptózu, ale i pro další metabolické pochody v buňce. Zásadní roli hrají ceramidy také jako funkční součást kožní bariéry [1,2].



Obrázek 2*: Obecná struktura ceramidu – bazický aminoalkohol sfingosin je na dusíku acylován mastnou kyselinou.*

2.1. Role ceramidů v buněčné signalizaci a apoptóze

, V mechanismu programové buněčné smrti byly uvažovány dvě hlavní teorie mechanismu účinku. První z těchto dvou hypotéz předpokládala, že ceramidy se metabolizují na dihydroceramidy, které jsou pro buňku toxické. Tato teorie ovšem nebyla podložena důkazy, respektive při testování in vitro nedocházelo k apoptóze buněk, k nimž byly dihydroceramidy přidány. Druhá teorie počítala s kombinovanou účastí tumor-nekrotizujícího faktoru alfa (TNF-α) a ceramidu, jako druhého posla. Endogenně syntetizované ceramidy dle této teorie zprostředkovávají signál, který přináší právě TNF-α. Tato teorie byla podpořena i pokusy in vitro, kdy intracelulárně přidaný ceramid indukoval fragmentaci DNA a následnou buněčnou smrt. Další experimenty ukázaly, že ceramidy hrají roli při apoptóze buněk aktivních i neaktivních v krvetvorbě, včetně fibroblastů a fibrosarkomálních buněk. Díky tomuto zjištění je další výzkum ceramidů nejen na této úrovni velmi žádaný [3].

2.2. Význam ceramidů v kůži, rohová vrstva kůže

Hmotnost lidské kůže se pohybuje okolo 5 kg a její povrch dosahuje téměř 2 m^2. Kůže člověka se skládá ze dvou základních vrstev – dermis, která díky bohaté kapilární a nervové síti zajišťuje výživu a epidermis, jejíž funkce je z velké části ochranná. Epidermis se skládá z dalších 4 vrstev stratum basale, spinosum, granulosum a corneum. Hlavní bariérovou funkci zajišťuje nejsvrchnější rohová vrstva – *stratum corneum*. Bariérová funkce kůže spočívá v ochraně organismu před vnějšími toxickými vlivy a v zabránění nadměrným ztrátám vody z organismu [4,5].

Stratum corneum (rohová vrstva kůže), nejsvrchnější vrstva pokožky, tvoří hlavní složku kožní bariéry. Tato vrstva se skládá z plně zrohovatělých buněk - korneocytů, které vznikly migrací a odumřením keratinocytů z hlubších vrstev pokožky. Korneocyty jsou buňky zploštělé, které se skládají do 10-20 mikrometrů široké vrstvy. Struktura uspořádání korneocytů je často popisována jako „cihly a malta“, kdy „cihly jsou korneocyty, a jako „maltu“ označujeme mezibuněčný prostor. Mezibuněčné prostory SC tvoří lipidová matrix. V lipidové matrix jsou ekvimolárně zastoupeny ceramidy, cholesterol a volné mastné kyseliny dále pak v mnohem menším množství cholesteryl-sulfát. Za zmínku stojí, že ačkoliv jsou výše uvedené látky zastoupeny ekvimolárně, hmotnostně představují ceramidy asi 50 % matrix. Tyto látky vznikly ze svých prekurzorů, které jsou obsaženy v keratinocytech v granulózní vrstvě epidermis. Lipidy matrix jsou pravděpodobně poskládány v lamelárním uspořádání, kdy se tyto „lamely“ mohou v pravidelné periodicitě opakovat, nebo tvořit dvojvrstvy velice podobné dvojvrstvám fosfolipidovým, které známe ze složení buněčných membrán [4,5,6].

Právě unikátní složení lipidových lamel zaručuje ochrannou vrstvu pokožky, kdy struktura ceramidů, jejímž základem je hydrofilní a hydrofobní část, zabezpečuje nepropustnost pro nebezpečné látky (toxiny, alergeny, patogeny, UV záření) z vnějšího prostředí a naopak brání úniku vody z organismu do vnějšího prostředí. Ve složení *stratum corneum* bylo popsáno zatím 15 základních druhů ceramidů [4,5,6,31].

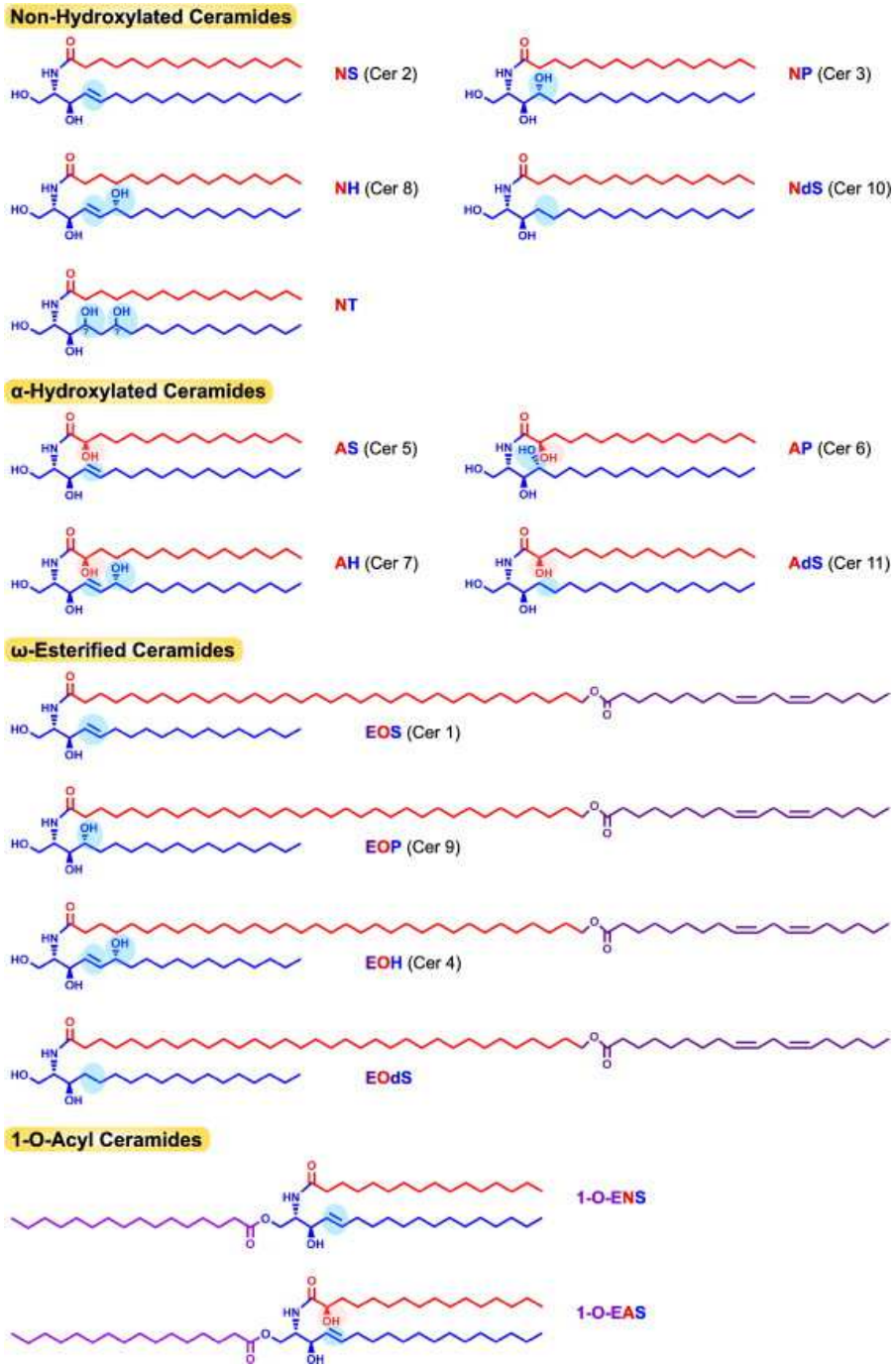
2.3. Struktura ceramidů, ceramidy lipidové matrix

Molekulu ceramidu můžeme charakterizovat jako sfingoidní bázi tvořenou nejčastěji sfingosinem, 6-hydroxysfingosinem, fytosfingosinem nebo dihydrosfingosinem, na jejíž primární aminoskupinu v poloze 2 je amidicky navázána mastná kyselina. Délka řetězce mastné kyseliny může být v délce od 2 do 34 uhlíků. Nejčastěji nacházíme v lipidové matrix lidské kožní bariéry ceramidy acylované kyselinou lignocerovou s délkou 24 uhlíků nebo 22 uhlíkatou kyselinou behenovou. Mastná kyselina může být hydroxylována v poloze α nebo ω. Jako velmi důležitá se ukázala taktéž konfigurace dvojné vazby v poloze 4 sfingosinu. Ta je u přirozených ceramidů vždy v poloze 4-*E (trans-)* [1,7,8].

V lipidové matrix lidského *stratum corneum* bylo prozatím potvrzeno 15 různých druhů ceramidů, které se od sebe liší právě strukturami sfingoidní báze nebo řetězce mastné

kyseliny. Na základě těchto obměn se také určuje nomenklatura ceramidů. Tuto nomenklaturu dle Motty popisuje **obrázek 3** [7,8,31].

Jako zcela zásadní se ukázala přítomnost ceramidů hydroxylovaných v poloze ω, které jsou v této poloze buď esterifikovány kyselinou linolovou, nebo kovalentně navázány na vnější povrch korneocytů [7,9].



Obrázek 3: *Rozdíly mezi jednotlivými druhy ceramidů nacházejících se v lidské kůži a jejich nomenklatura dle Motty. Popis pomocí písmen se zakládá na skládání zkratek pojmenovávajících jednotlivé stavební části ceramidu* [31]

2.4. Rozdíly zastoupení lipidů v zdravé a poškozené kůži

Při různých kožních onemocněních, kdy dochází k vzniku suché pokožky, případně lézí se významně mění složení lipidové matrix. Jedná se především o atopickou dermatitidu, ichytózy a psoriázu, poruchy kožní bariéry se nachází také u komplexních poruch metabolismu sfingolipidů jako je Niemann-Pickův syndrom a 2. typ Gaucherovy choroby [10].

U atopické dermatitidy i psoriázy dochází k velmi významnému úbytku lipidů v rohové vrstvě kůže. Nejvíce zasaženými lipidy jsou především ceramidy, nejvíce ty s dlouhým řetězcem. U pacientů, kteří trpí psoriázou nebo atopickou dermatitidou byl prokázán úbytek ceramidů o až 50% celkové hmotnosti oproti zdravým jedincům. Celkový úbytek ceramidů byl pozorován u postižených s kožními lézemi i bez nich, přičemž u v místě bez lézí se pohybovala hladina celkového počtu ceramidů o 25% hmotnosti níže než u zdravého jedince, v případě výskytu kožních lézí se hladina snížila ještě o dalších 12-23%. Nejvíce postiženy jsou ω-hydroxylované, resp. esterifikované ceramidy s dlouhými řetězci, které tvoří vazby s proteiny korneocytů. Ceramidy s krátkými řetězci bývají při těchto onemocněních naopak zastoupeny více než u kůže zdravé. Tímto nepoměrem dochází zřejmě k výraznému zhoršení bariérové funkce rohové vrstvy kůže a zvýšení permeability jak pro toxické látky z vnějšího prostředí, tak i pro vodu z organismu [9,10,11,12].

Hladiny cholesterolu a jeho esterů se při pozorování zdravé i atopické kůže příliš nemění. Volné mastné kyseliny rohové vrstvy kůže jsou zastoupeny u atopických pacientů až 3x více v místech bez lézí a až 5x více v místě s kožními lézemi oproti zdravé kontrole. Nejasné zároveň stále je, zda změny obsahu lipidů v *stratum corneum* při kožních onemocněních jsou příčinou nebo následkem těchto onemocnění. Topické podávání ceramidů onemocnění prokazatelně zlepšuje [9,10,11,12].

Při genetických onemocněních metabolismu sfingolipidů dochází ke změnám na kůži jen u některých pacientů s Niemann-Pickovým syndromem, u pacientů s Gaucherovou chorobou je kůže poškozeno pouze při typu 2. U Gaucherovy choroby nalézáme zvýšenou aktivitu β-glukocerebrosidázy, a tím zvýšené množství glukosylceramidů oproti sníženému množství běžně zastoupených ceramidů. Tento nepoměr vede pravděpodobně k porušení kožní bariéry a vzniku suché až atopické pokožky. Při Niemann-Pickovu syndromu je snížená aktivita sfingomyelinázy a dochází ke kumulaci sfingomyelinu na úkor ceramidů v epidermis, což taktéž snižuje její bariérovou funkci [10].

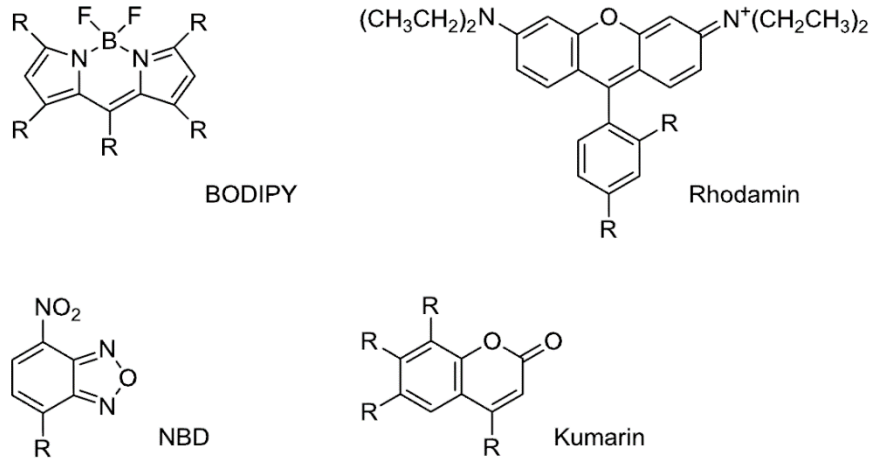
2.5. Vliv exogenních ceramidů na regeneraci kožní bariéry

Předpokládá se, že topicky podávané ceramidy napomáhají k regeneraci poškozené kožní bariéry při kožních onemocněních. Randomizovaná studie na psech s atopickou dermatitidou ukázala výrazné zlepšení u 85% pokusných jedinců. Topicky podávaných ceramidů využívají mnohé kosmetické firmy a můžeme je tak najít u mnoha kožních

preparátů. Mechanismus regenerace kožní bariéry není však stále zcela objasněn. K tomuto účelu se vyvíjejí různými způsoby značené ceramidy, aby bylo možné tento mechanismus objasnit [13].

2.6. Fluorescenčně značené lipidy

Při značení lipidů pro objasnění jejich funkce v mnoha biologických, biochemických a metabolických pochodech se využívají mnohé druhy značení těchto molekul. Nejčastěji se používají fluorescenční chemické značky – barviva, která se navazují buď do sfingosinové části nebo častěji na zbytek mastné kyseliny. Obecně používané fluorescenční značení ukazuje **obrázek 4.** K nejčastěji používaným strukturám pro značení lipidů patří rhodamin, pyren, kumarin, NBD (7-nitrobenzo-[c][1,2,5]oxa-1,3-diazol) a BODIPY 4,4´-difluoro-4-bora-(3a,4a)- diaza-*s*-indacen. [14,15,16,17]



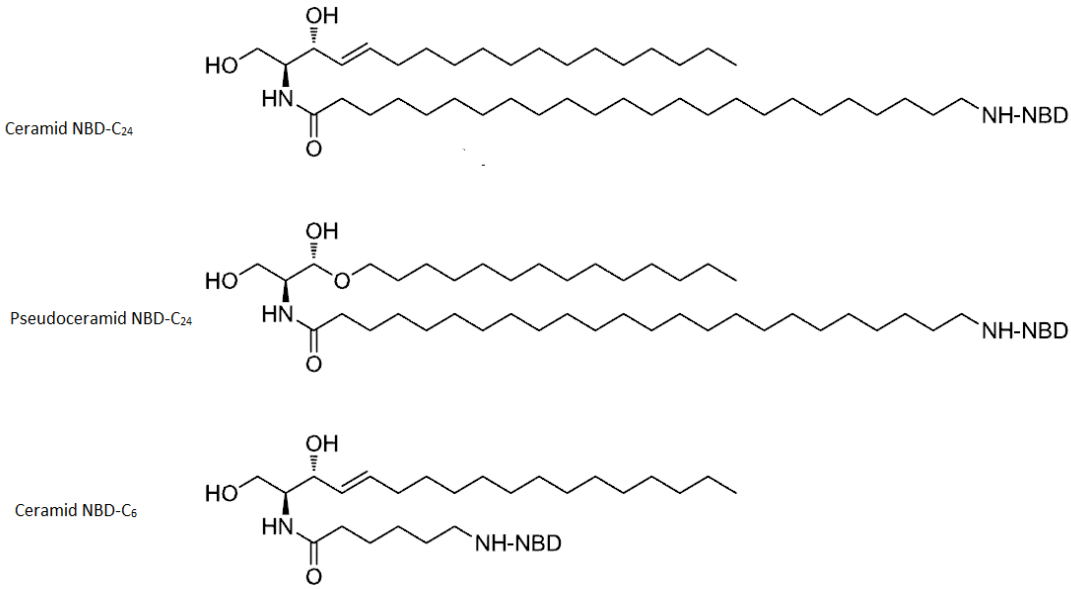
Obrázek 4*: Nejčastěji používané molekuly k značení lipidů. R na tomto obrázku prezentuje lipidový zbytek nebo funkční skupinu.* [16]

Při značení lipidů těmito fluorescenčními značkami hraje velmi důležitou roli nejen umístění na molekule lipidu (pro permeabilitní studie se používá značení nejčastěji v acylovém řetězci lipidu, pro metabolismus sfingolipidů v sfingosinové části), ale také charakter samotné značky. Prakticky ve většině případů se jedná o poměrně velké molekuly, které vykazují vlastní fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti. Díky tomuto zjištění se předpokládá, že tyto molekuly poměrně zásadně mění chování a metabolismus značených lipidů, oproti lipidům přirozeným. Největším problémem se ukazuje změna hydrofilně-lipofilní rovnováhy takto značených lipidů [14,15,16,17].

2.7. Fluorescenčně značené ceramidy a jejich analoga ve studiu kožní bariéry

K objasnění mechanismu regenerace kožní bariéry pomocí topicky podávaných ceramidů a zjištění vlastností kožní bariéry ve *stratum corneum* jako takové se používají různě značené ceramidy a jejich analoga. Díky svým velmi dobrým fluorescenčním vlastnostem dominuje značení pomocí NBD a BODIPY. Látka BODIPY vykazuje oproti NBD vyšší fluorescenci a zároveň lépe interkaluje mezi lipidy lipidové matrix *stratum corneum*. BODIPY také vykazuje lepší pozorovatelnost v červených a zelených vlnových délkách.[16].

V regeneraci kožní bariéry se ukázala jako velmi důležitá délka acylového řetězce jednotlivých ceramidů a jejich analogů. NBD značené ceramidy s krátkým řetězcem (C6) vykazovaly velice rychlý prostup přes *stratum corneum* do epidermis a následný prostup do Golgiho aparátu (2 h). Naopak značené ceramidy s delším řetězcem (NBD C_{24} –Ceramid) nebo jejich analoga (Pseudoceramid NBD C_{24}), přes rohovou vrstvu kůže prakticky nepronikly. NBD značený C_6- a obě dlouhořetězcová analoga ukazuje **obrázek 5.** Předpokládá se tedy, že délka acylového řetězce velmi významně ovlivňuje schopnosti ceramidů penetrovat kožní bariéru. Dlouhořetězcové ceramidy a jejich analoga zřejmě zároveň vykazují afinitu k povrchovým strukturám korneocytů, čímž je možnost prostupu také snížena [16,17,18].

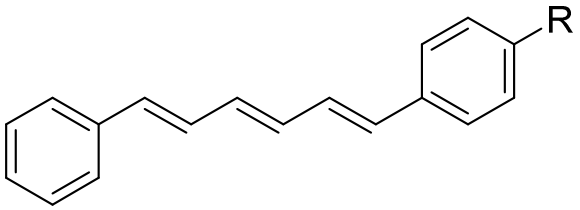


***Obrázek 5**: NBD značené ceramidy použité při studii závislosti délky acylového řetězce na penetraci.*

2.8. Fluorescenční polyenové značky

Řešením problematiky změny vlastností lipidů, potažmo ceramidů po zavedení objemného (NBD, BODIPY) fluoroforu by bylo zavedení takového fluorescenčního značení, které by napodobovalo strukturu přirozeného ceramidu. Ukazuje se, že takovéto vlastnosti by mohly mít ceramidová analoga, do jejichž řetězců je zabudován polyenový

flurofor s konjugovaným systémem *trans*- dvojných vazeb. Jedním z prvních takovýchto fluroforů byla již před 40 lety kyselina parinárová (9*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*)-oktadeka-9,11,13,15-tetraenová kyselina) a její izomery, obsahující systém 4 konjugovaných dvojných vazeb, která však nevykazovala dostatečnou emisní vlnovou délku potřebnou k mikroskopii. Dalším podobným fluoroforem je (1*E*, 3*E*, 5*E*)-1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) (**obrázek 6**). Značení lipidů a sledování živých kultur pomocí DPH se jeví jako úspěšné, především díky velice dobře vykazované fluorescenci a fotochemické stabilitě tohoto fluorofu. Nicméně díky přítomností dvou fenylů není zcela jisté, že nedochází k změnám chování takto značených lipidů, jako je tomu u výše uvedených [14,15,19,20,21].



***Obrázek 6**: DPH fluorofor, R představuje molekulu navázaného lipidu*

Velmi nadějným fluroforem, který má „mimikry“ přirozeného ceramidu se zdá být lineární řetězec obsahující systém pěti *trans*- dvojných vazeb v konjugaci. Tyto lineární flurofory dokonale napodobují strukturu přirozených lipidů a jsou proto velmi nadějnou možností nejen při monitorování lipidů v rohové vrstvě kůže, ale prakticky ve všech možných biologických dějích, kde se nachází lipidy s lineárním řetězcem. Díky tomuto značení byly v roce 2010 zobrazeny etherové lipidy, které hrají velmi důležitou roli v mozku [14,19].

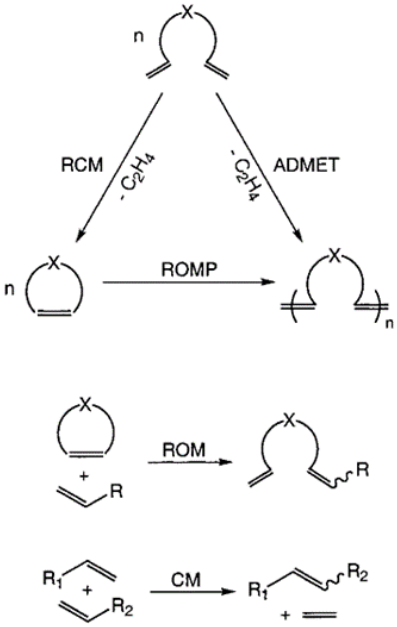
Při syntéze těchto polyenových značek se vycházelo nejprve z pentaenové kyseliny, s níž byla však obtížná manipulace. Proto pro zavedení desetiuhlíkatého polyenového fluroforu na molekulu lipidu byla použita Wittigova reakce, která vycházela z hexadienalu a fosfoniové soli bromderivátu methyldioxolanu. Tento polyenový řetězec se ukázal jako téměř ideální nástroj pro zobrazování lipidů v *in vivo* studiích. Takto značené lipidy nejsou nijak negativně ovlivněny a veškeré biochemické a metabolické pochody probíhají jako u lipidů přirozených. Strukturní podobnost polyenového fluorescenčního sfingomyelinu se sfingomyelinem přirozeným ukazuje **obrázek 7.** Trochu problematická se ukázala fotochemická stabilita těchto polyenových značek. Ta byla poměrně nízká, a tak se jako zobrazovací metoda užívá dvoufotonová mikroskopie [14,19

Vzhledem k charakteru polyenového řetězce je zřejmé, že tento fluorofor můžeme při studiu ceramidů použít pro označení jak v sfingosinové, tak acylové části molekuly ceramidu. Toto přináší nesmírné výhody a lze tak velmi dobře studovat například závislost délky acylového řetězce na penetraci přes kožní bariéru aniž by byl acylový řetězec jakkoliv ovlivněn. [14,19]

***Obrázek 7**: Strukturální podobnost mezi přirozeným sfingomyelinem (vpravo) a polyenově značeným analogem (vlevo, polyen je vyznačen zeleně)* [19]

2.9. Grubbsovy metateze = metateze olefinů

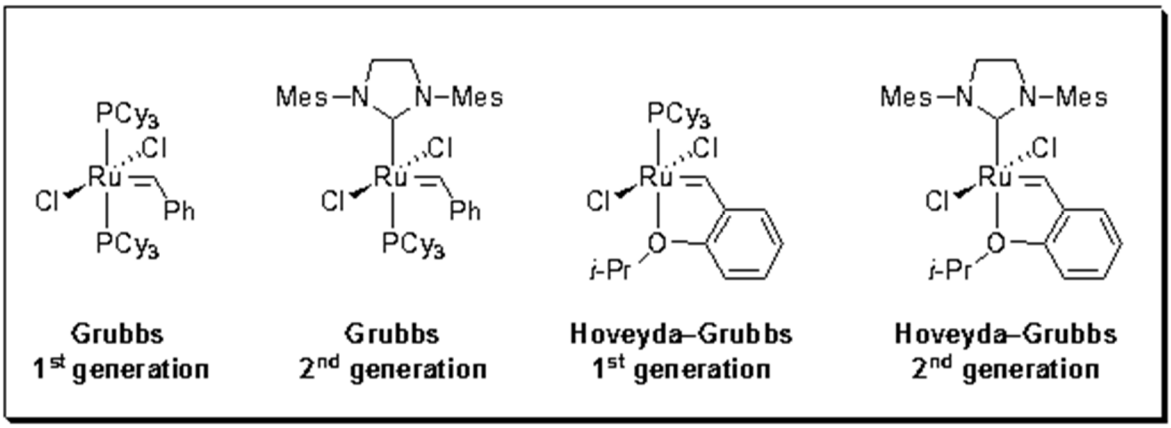
Při přípravě polyenového fluorescenčního ceramidu jsou velmi dobře využitelné metateze olefinů- Grubbsovy metateze. Název nesou podle Roberta Howarda Grubbse, který za představení katalyzátorů pro metatezi olefinů získal v roce 2005 Nobelovu cenu za chemii. Název pochází z řečtiny, kdy Meta = změna a Tithemi = místo. Metateze je tedy proces, při kterém dochází k „rozpojení“ dvojné vazby mezi uhlíky a „změně“ místa této vazby, resp. „spojení“ s jinou dvojnou vazbou. Metateze olefinů mohou vést dle nastavených podmínek a použitém substrátu k různým produktů a dle toho metateze rozdělujeme. Rozdělení ukazuje **obrázek 8.** [22,25]



***Obrázek 8**: Druhy metateze olefinů*
RCM = Ring closing metathesis
ROM=Ring opening metathesis
ADMET= Acyclic diene metathesis
ROMP= Ring opening metathesis and polymerization
CM=cross metathesis
[22]

2.10. Katalyzátory používané při metatezích

Při vývoji katalyzátorů potřebných pro metatezi vycházel Grubbs a jeho kolegové ze sloučenin ruthenia. Jedním z prvních sloučenin byl hydrát chloridu ruthného. Potřeba lepších výtěžků a rozdílným potřebám pro různé metateze bylo vyvinuto více než deset druhů katalyzátorů na bázi ruthenia. Nejdůležitějšími katalyzátory jsou Grubbsův katalyzátor první generace, používaný především při ROMP (Kruh otevírajicí metateze s následnou polymerizací) a ADMET (Acyklická metateze dienů), dále při CM terminálních olefinů, Grubbsův katalyzátor druhé generace, který zvyšuje účinnost při RCM a používá se při CM substituovaných olefinů, Grubbsův-Hoveydův katalyzátor první generace využitelný při RCM v makrocyklech a Grubbsův-Hoveydův katalyzátor druhé generace používaný za nižších teplot u elektronově deficientních sloučenin. Struktury těchto čtyř hlavních katalyzátorů popisuje **obrázek 9** [22,24,25].



***Obrázek 9**: Grubbsovy katalyzátory na bázi ruthenia (PCy_3= tricyklohexylfosfin, Mes=Mesitylen, i-Pr=isopropyl)* [24]

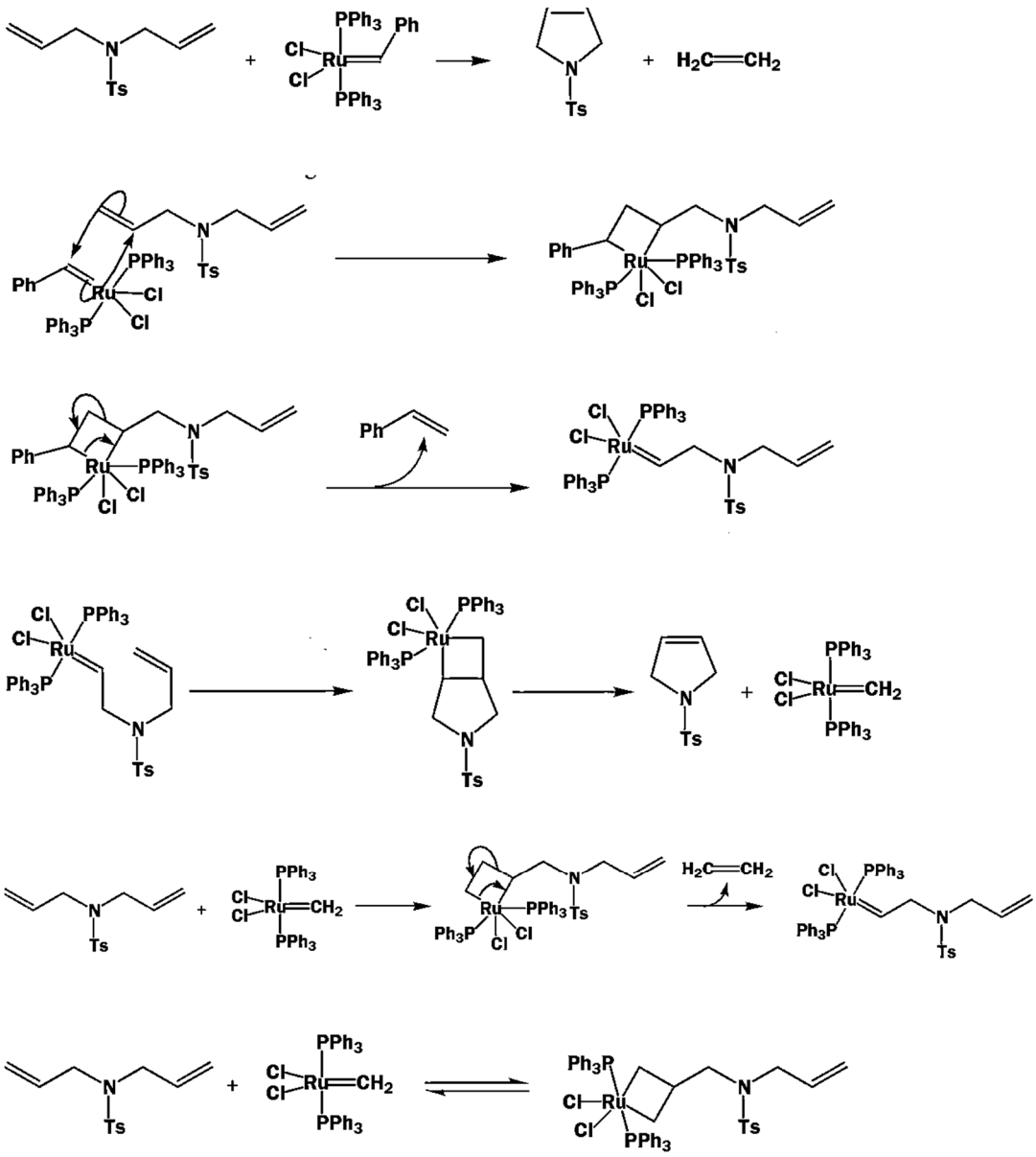
2.11. Mechanismus metateze

Mechanismus metateze probíhá jako tzv. 2+2 cyklo-adiční reakce. Reakce je v podstatě schopna probíhat neustále, dokud se „nespotřebuje“ veškerý katalyzátor, případně dvojné vazby olefinů, které tuto reakci poskytující (například při převážení reakční rovnováhy na stranu produktů nebo výchozí látky). Mechanismus metateze popsaný na kruh uzavírající metatezi je ukázán na **obrázku 10** [23].

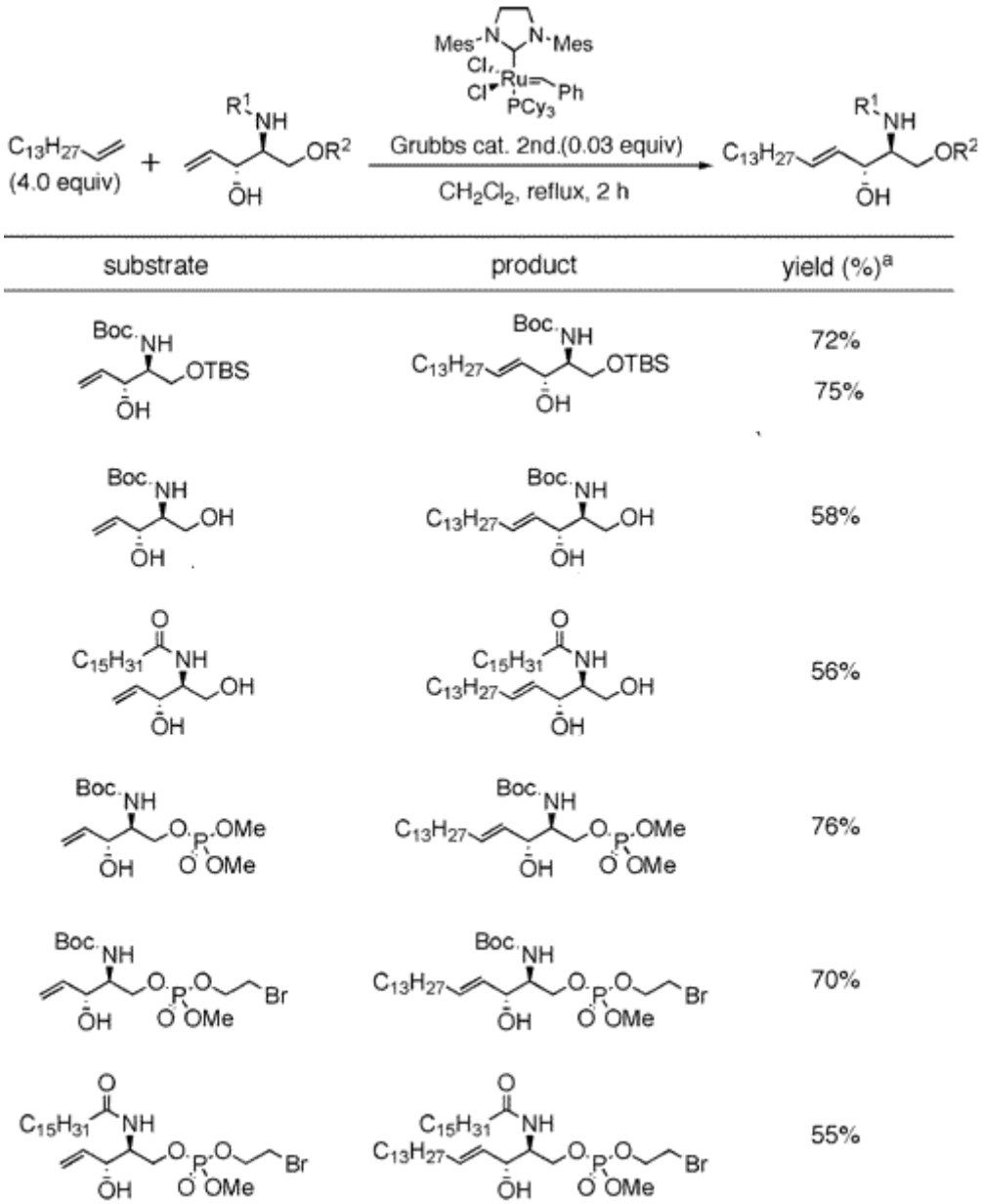
2.12. Příklady využití metateze v syntéze lipidů

Grubbsovy metateze našly široké využití v syntéze například sfingolipidů a jejich analog. Na **obrázku 11** jsou ukázány některé reakce. Další využití Grubbsovy metateze je

popsáno v experimentální části této práce. Výhodou používání metateze je teoretické dosahování velice uspokojivých výtěžků při práci s velmi malými množstvími látek[26].



***Obrázek 10**: Cykloadiční mechanismus metateze olefinů.(PPh$_3$= trifenylfosfin, Ts= toluensulfonyl.* [23]



***Obrázek 11**: Příklady využití metateze v přípravě sfingolipidů (R=H,TBS,Boc Boc= terc-butyloxykarbonyl, TBS= terc-butyldimethylsilyl*) [26]

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie a přístroje

Používané chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Rozpouštědla byla zakoupena od firmy Penta a od firmy Sigma-Aldrich.

Pro strukturální charakterizaci látek byly využity přístroje Varian Mercury-Vx BB (NMR analýza, ^{1}H při 300 MHz a ^{13}C při 75 MHz, a také ^{1}H při 500 MHz a ^{13}C při 125 MHz), hmotnostní spektrometr LCQ Max advantage (Thermo Finnigan, San Jose, U.S.A.) a Koflerův přístroj (měření teploty tání pevných látek).

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na TLC deskách (silikagel 60 F_{254}) od firmy Merck, při detekci byla použita nespecifická detekční směs složená z $CeSO_4$, $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$, H_2SO_4 a vody nebo ninhydrin.

3.2. Syntéza

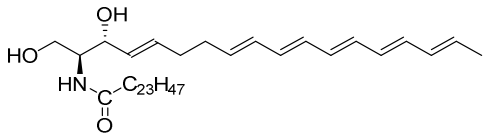
Cílem projektu bylo připravit polyenový fluorescenční ceramid. Byly navrženy a vyzkoušeny celkem tři syntetické cesty, které budou v mé práci popsány.

V **syntéze 1** jsem vycházel z Garnerova aldehydu, který byl podroben reakci s vinylmagnesiumbromidem za přítomnosti hexamethylfosforamidu. Dalším navrženým krokem bylo odchránění vzniklého produktu, následné navázání silylových chránících skupin a acylace. Dalším krokem reakce měla být Grubbsova metateze, tvorba fosfoniové soli a následná Wittigova reakce.

Syntéza 2 vycházela taktéž z Garnerova aldehydu, ten byl v této cestě podroben reakci s chlorovaným terminálním alkynem – 5-chlorpent-1-ynem, respektive jeho alkynidem. Dalším krokem byla redukce trojné vazby vzniklého produktu na vazbu *trans*-dvojnou. Při tomto kroku bylo vyzkoušeno hned několik možností selektivní redukce. Další zamýšlené kroky této reakční cesty by byly silylace, tvorba fosfoniové soli a Wittigova reakce s polyenovým aldehydem.

Syntéza 3 vycházela z komerčně zakoupeného ceramidu, který byl podroben Grubbsově metatezi s 5-brompent-1-enem. Následující kroky této reakční cesty jsou podobné **syntéze 2**

Pro všechny tři předchozí syntézy byl, jako produkt vstupující do závěrečných kroků reakcí, připraven polyenový aldehyd (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenal. Příprava tohoto produktu násobnou Wittigovou reakcí je v této práci popsána jako **syntéza 4**.

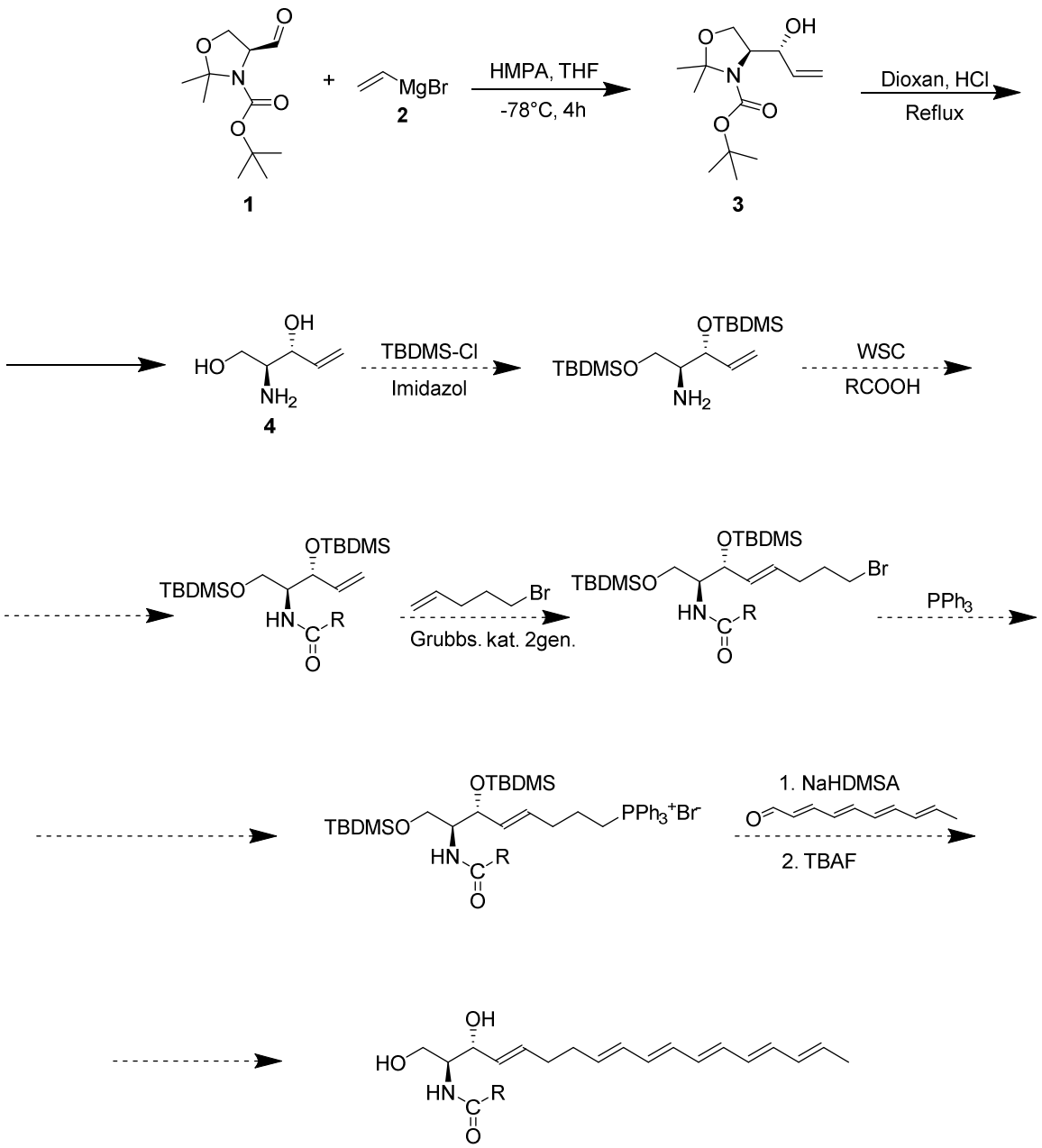


***Obrázek 12**: Polyenový fluorescenční ceramid*

3.2.1. Syntéza 1

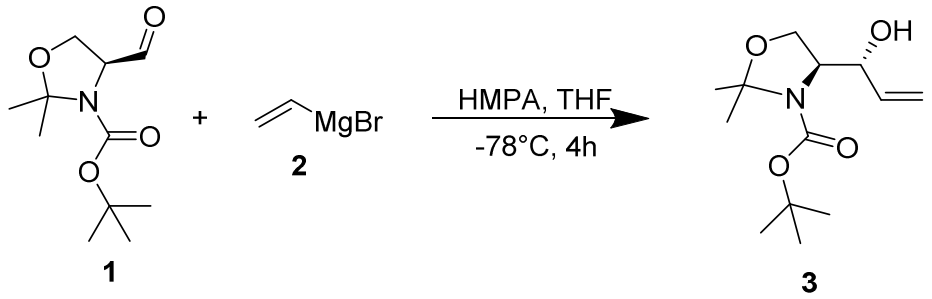
První syntéza vycházela z Garnerova aldehydu (**1**), který byl podroben reakci s vinylmagnesiumbromidem (**2**) za přítomnosti hexamethylfosforamidu (HMPA). HMPA se do reakce přidává jako činidlo podporující selektivní průběh reakce za vzniku *R* konfigurace hydroxylové skupiny v poloze 3 produktu. Vzniklý *terc*-butyl (*S*)-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (**3**) byl zbaven *terc*-butyloxykarbonylové chránící skupiny pomocí kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Získaný produkt: (2*S*,3*R*)-2-aminopent-4-en-1,3-diol (**4**) byl však získán ve velmi malém výtěžku, proto nebyl podroben dalším plánovaným krokům. Celá navržená reakční cesta je uvedena ve **schématu 1** – viz níže.

Schéma 1 – Syntéza 1



R= $C_{23}H_{47}$, $C_{17}H_{35}$
HMPA= Hexamethylfosforamid
THF= Terahydrofuran
TBDMS-Cl= *Terc*-butyldimethylsilylchlorid
WSC= 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
PPh_3= Trifenylfosfin
NaHDMSA= bis(trimethylsilyl)amid sodný
TBAF= Tetrabutylamonium-fluorid

3.2.1.1. Příprava *terc*-butyl(*S*)-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (3)



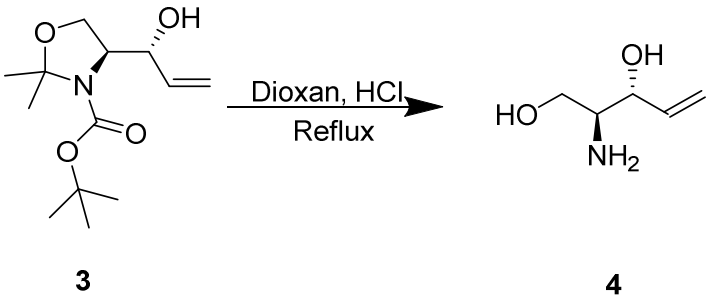
975 mg (4,252 mmol) Garnerova aldehydu **(1)** bylo pod atmosférou dusíku rozpuštěno v 10ml bezvodého tetrahydrofuranu. K reakční směsi byly injekčně přikapány 3 ml hexamethylfosforamidu (HMPA) (17,243 mmol). Reakční směs byla ochlazena na 78°C, poté bylo injekční stříkačkou přidáno 17 ml 1M roztoku vinylmagnesiumbromidu **(2)** v bezvodém THF. Vinylmagnesiumbromid byl přikapáván opatrně a postupně aby nedošlo ke zvýšení reakční teploty. Směs byla ještě hodinu míchána při -78°C a poté bylo chlazení vypnuto. Podle TLC (mobilní fáze hexan:ethyl-acetát 6:1) již reakce dále neprobíhala. Při ohřátí na laboratorní teplotu byla reakce ukončena přidáním 30ml nasyceného roztoku chloridu amonného a vytřepána 3x20 ml diethyletheru. Spojené etherové frakce byly vysušeny pomocí bezvodého síranu sodného, přefiltrovány přes vatu a odpařeny na rotační vakuové odparce. Směs po odpaření do sucha byla přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází hexan:ethyl-acetát v poměru 6:1. Bylo získáno 236 mg produktu **(3)**, v podobě nažloutlé olejovité kapaliny. Výtěžek reakce činil 21,57%.

***Terc*-butyl (*S*)-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (3)**

Žlutá olejovitá kapalina, molární hmotnost: 257,33 g/mol. TLC: R_f=0,37 (hexan:ethyl-acetát 6:1)

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5,85 (ddd, *J*= 16,2 Hz, 10,5 Hz, 5,1 Hz, 1H), 5,36 (d, *J*= 17,2 Hz, 1H), 5,21 (dd, *J*= 10,5 Hz, 1,5 Hz, 1H), 4,34-4,20 (m, 1H), 4,20-4,04 (m, 1H), 4,02 (d, *J*= 3,0 Hz, 1H), 4,00-3,76 (m, 1H), 1,56 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,47 (s, 9H)
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ= 154,29, 136,68, 117,91 116,21, 94,49, 81,17, 74,24, 64,98, 61,98, 28,32, 26,24, 24,45

3.2.1.2. Příprava (2*S*,3*R*)-2-aminopent-4-en-1,3-diolu (4)



K 236 mg (0,917mmol) t*erc*-butyl(*S*)-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu **(3)** z předchozí reakce bylo přidáno 15ml 1 M kyseliny chlorovodíkové a 15 ml dioxanu. Reakce byla zahřívána pod zpětným chladičem k varu 3 hodiny. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla smě vytřepána 3x15 ml diethyletheru a poté zalkalizována pomocí 1M hydroxidu sodného na pH=9. Směs byla poté ještě vytřepána 3x15 ml ethyl-acetátu k odstranění výchozích látek. Vodná frakce obsahující produkt byla zahuštěna na rotační vakuové odparce, rozpuštěna v 20 ml horkého methanolu následně zfiltrována. Produkt byl precipitován pomocí 3 ml chloroformu. Vzniklé bílé krystaly byly zfiltrovány a vysušeny ve vakuu. Bylo získáno 23 mg bílé krystalické látky. Výtěžek reakce činil 22,13%.

(2*S*,3*R*)-2-aminopent-4-en-1,3-diol (4)

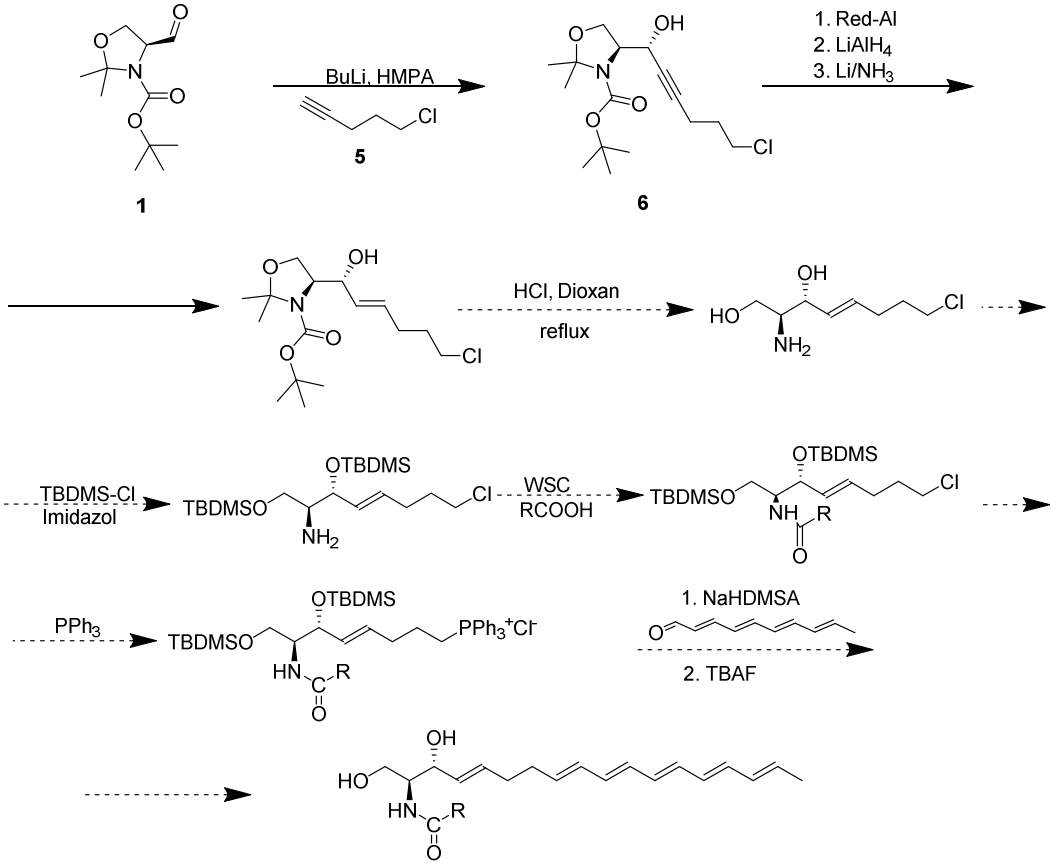
Bílá krystalická látka, molární hmotnost 117,15 g/mol, TLC R_f=0,28 (chloroform:methanol 10:1). Teplota tání 43-45°C (literatura uvádí 43-45°C [27].)

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): δ 5,89 (ddd, *J* = 17,3, 10,5, 5,9 Hz, 1H), 5,42 (dt, J = 17, 1,5 Hz, 1H), 5,30 (dt, J = 10,4, 1,5 Hz, 1H), 4,31 (ddt, *J* = 6,1, 4,6, 1,5 Hz, 1H), 3,77 (dd, J = 11,5, 4,2 Hz, 1H), 3,65 (dd, J = 11,5, 8,1 Hz, 1H), 3,22-3,12 (m, 1H).
^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): δ 137,36, 118,27, 71,61, 59,91, 58,01

3.2.2. Syntéza 2

Druhý syntetický postup opět vycházel z Garnerova aldehydu **(1)**, ten byl tentokrát podroben reakci s terminálním alkynidem odvozeným od 5-chlorpent-1-ynu **(5)**. K reakci docházelo v přítomnosti butyllithia a HMPA za vzniku *terc*-butyl(4*S*)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu **(6)** Dalším krokem byla redukce trojné vazby na *trans*-dvojnou za vzniku (4*S*)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu **(7)**. Byly vyzkoušeny celkem 3 možné způsoby redukce trojné na trans dvojnou vazbu, které budou popsány níže. Další reakční kroky - odchránění *terc*-butyloxykarbonylové chránící skupiny, silylace, acylace a reakce s polyenovým aldehydem je velmi podobná s první syntézou. Celou reakční cestu popisuje **schéma 2** uvedené níže.

Syntéza 2 – Schéma 2



R= $C_{23}H_{47}$, $C_{17}H_{35}$

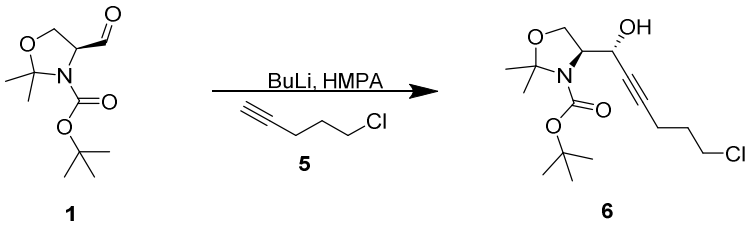
HMPA= Hexamethylfosforamid **BuL**i= Butyllilthium

THF= Terahydrofuran **TBDMS-Cl**= *Terc*-butyldimethylsilylchlorid

PPh3= Trifenylfosfin **WSC**=1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

NaHDMSA= bis(trimethylsilyl)amid sodný **TBAF**= Tetrabutylamonium-fluorid

3.2.2.1 Příprava *terc*-butyl-(4*S*)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (6)



590 mg (0,6 ml, 5,756 mmol) 5-chlorpent-1-ynu **(5)** bylo pod atmosférou argonu za stálého míchání rozpuštěno v 40ml suchého THF. Reakční směs byla zchlazena na -78°C. Při této teplotě bylo přikapáno 3,5 ml (5,6 mmol) 1,6M butyllithia v hexanu. Po další hodině míchání při teplotě -78°C byly do reakce přikapány 2ml (11,429 mmol) HMPA a 997 mg (4,348 mmol) Garnerova aldehydu **(1)** rozpuštěného v 25 ml suchého THF. Reakční směs byla dále chlazena. Po 3 hodinách bylo chlazení vypnuto a po ohřátí směsi na laboratorní teplotu byla reakce ukončena opatrným přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného. Poté byla směs vytřepána 3x50 ml ethyl-acetátu. Spojené organické frakce byly vysušeny pomocí bezvodého síranu sodného a zfiltrovány. Filtrát byl poté odpařen na rotační vakuové odparce. Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií, mobilní fáze- chloroform : methanol 50:1. Bylo získáno 1230 mg žluté olejovité kapaliny. Výtěžek reakce činil 85,25%.

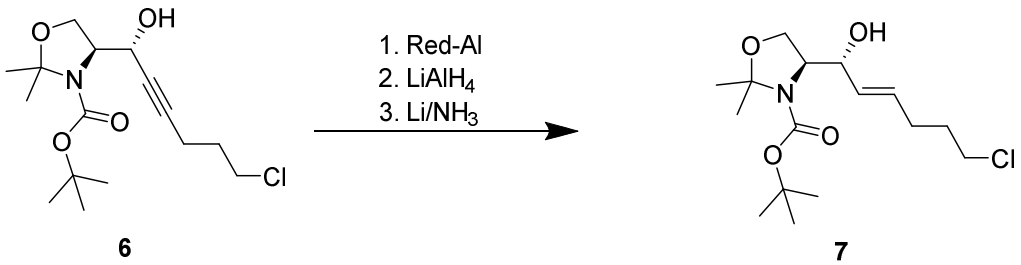
***Terc*-butyl-(4*S*)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát(6)**

Žlutá kapalina olejovité konzistence. Molární hmotnost 331,84 g/mol. TLC: R_f=0,48 (Chloroform : methanol 50:1).

^{1}H NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 4.51 (s, 1H), 4.25–3.79 (m, 4H), 3.63 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.41 (td, J = 6.8 Hz, 1.9 Hz, 2H), 2.00- 1.90 (m, 2H), 1,65 (s, 3H), 1,58(s, 3H), 1,49 (s, 9H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl3): δ = 154,31, 94,99, 84,37, 81,45, 79,06, 77,19, 65,09, 64,40, 43,54, 31,15, 28,33, 25,81, 16,17

3.2.2.2. Příprava *terc*-butyl(4*S*)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (7)



Dalším krokem reakce byla redukce trojné vazby na trans dvojnou. Tato redukce byla postupně prováděna třemi způsoby.

A) Redukce pomocí bis(2-methoxyethoxy)dihydridohlinitanu sodného (Red-Al)

100 mg (0,301 mmol) *terc*-butyl(4*S*)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu **(6)** bylo rozpuštěno v 10 ml suchého THF a pod atmosférou dusíku bylo zchlazeno na 0°C. Poté bylo injekční stříkačkou přikapáno 0,170ml (0,600 mmol) Red-Alu (70% roztok v toluenu). Roztok byl chlazen ještě 10 minut a poté byla chladící lázeň odstraněna. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě ještě 4 hodiny. Poté byla reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného (cca 5ml). Reakční směs byla vytřepána 3x10 ml diethyletheru. Spojené organické frakce byly odpařeny na vakuové rotační odparce. Vzorek reakční směsi byl podroben NMR analýze, která však přítomnost dvojné vazby vyloučila. Od redukce Red-Alem bylo tedy upuštěno.

B) Redukce pomocí tetrahydridohlinitanu lithného.

100 mg (0,301 mmol) **(6)** bylo rozpuštěno v 10 ml suchého THF pod atmosférou dusíku. 1 ml (1 mmol) 1M tetrahydridohlinitanu lithného bylo přikapáno injekční stříkačkou do reakční směsi. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem a v atmosféře dusíku k varu po dobu 15hodin. Poté bylo zahřívání vypnuto. Reakce byla ukončena 15 ml 15% roztoku hydroxidu sodného. Směs byla takto míchána ještě po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty. Poté byla směs přefiltrována přes vrstvu silikagelu a propláchnuta horkým chloroformem. Filtrát byl zahuštěn na rotační vakuové odparce a vzorek podroben NMR analýze. NMR analýza opět prokázala nepřítomnost dvojné vazby. Redukce tedy neproběhla.

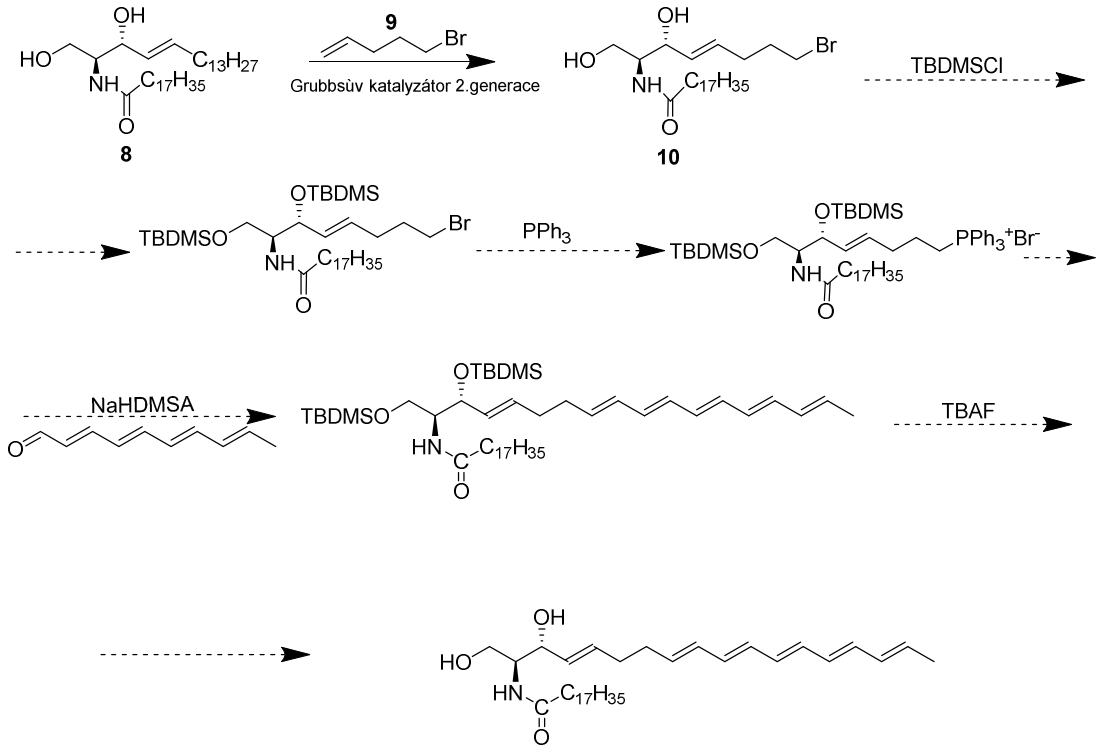
C) Redukce pomocí kovového lithia v amoniaku

50 mg kovového lithia bylo rozdrobněno na malé kousky a reaktivováno ponořením do methanolu, poté bylo opláchnuto v diethyletheru a hexanu. Baňka s rozdrobněným lithiem byla umístěna na olejovou vakuovou pumpu k vysušení zbytkové vlhkosti. Baňka byla poté zavzdušněna argonem a zchlazena na -78°C. Za stálého chlazení byl do baňky přes promývačku s pevným hydroxidem sodným zaveden plynný amoniak, který v baňce díky podchlazení kapalněl. Jak se kovové lithium v amoniaku postupně rozpouštělo, vznikal temně modrý roztok. Když bylo všechno lithium rozpuštěno a zbarvení zůstávalo temně modré, byl přívod amoniaku zastaven. Temně modré zabarvení nezmizelo, a tak byl do baňky přikapán roztok 100 mg (0,301 mmol) **(6)** rozpuštěného v 10 ml bezvodého THF. Reakce byla ponechána 2 hodiny, poté bylo chlazení vypnuto. Po vystoupání teploty na laboratorní byla reakce ukončena velmi opatrným přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného. Když přestala směs prudce reagovat, bylo přidáno ještě cca 5ml vody. Reakční směs byla vytřepána 3x15 ml chloroformu a spojené organické frakce odpařeny na rotační vakuové odparce. U vzorku byla změřena hmotnostní spektra, která ukázala, že k redukci nedošlo nebo došlo ve velmi malém poměru oproti výchozí látce.

3.2.4. Syntéza 3

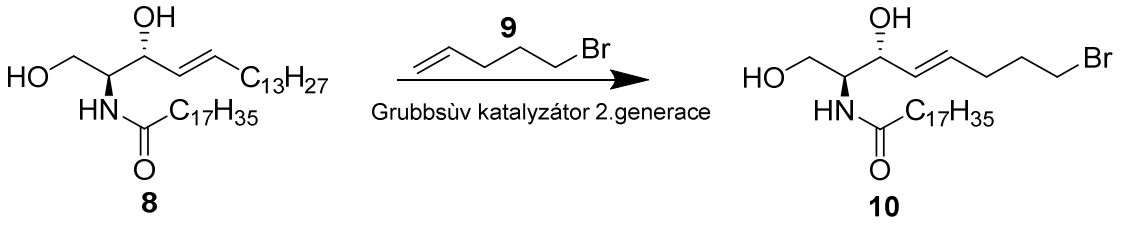
Třetí syntetická cesta vycházela z komerčně dostupného ceramidu *N*-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)stearamidu **(8)** izolovaného z biologického materiálu (vepřový mozek), který byl podroben Grubbsově metatezi s 5-brompent-1-enem **(9)**. Dalšími kroky v syntéze měla být silylace, reakce s trifenylfosfinem za vzniku fosfoniové soli a připojení polyenu pomocí Wittigovy reakce. Celou navrženou syntézu ukazuje schéma 3.

Syntéza 3- Schéma 3



TBDMS-Cl= *Terc*-butyldimethylsilylchlorid **PPh3**= Trifenylfosfin
NaHDMSA= bis(trimethylsilyl)amid sodný **TBAF**= Tetrabutylamonium-fluorid

3.2.4.1 Příprava *N*-((2*S*,3*R*,4*E*)-8-bromo-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)stearamidu (10)



100 mg (0,154 mmol) ceramidu **(8)** a 15 mg (0,017 mmol) Grubbsova katalyzátoru druhé generace bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého dichlormethanu. Pod atmosférou dusíku a za stálého míchání bylo injekční stříkačkou přikapáno 0,08 ml (100 mg, 0,687 mmol) 5-brompent-1-enu **(9).** Reakční směs byla poté zahřívána pod zpětným chladičem k varu 2,5 hodiny. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byla směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce a posléze dělena sloupcovou chromatografií (mobilní fáze: chloroform : methanol 50:1). Bylo izolováno 42,37 mg látky **(10).** Výtěžek reakce činil 46,79 %.

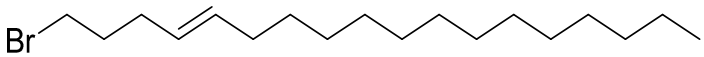
***N*-((2*S*,3*R*,4*E*)-8-bromo-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)stearamid**

Bílá amorfní látka. Molární hmotnost 504,59 g/mol. TLC: R_f= 0,42 (chloroform: methanol 50:1).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ= 6,35 (d, *J*=7,1 Hz, 1H), 5,82-5,67 (m, 1H), 5,60 (dd, *J*=15,5 Hz, 5,9 Hz, 1H), 4,33-4,27 (m, 1H), 3,95-3,86 (m, 2H), 3,74-3,64 (m,1H), 3,40 (t, *J*= 6,6 Hz, 2H), 2,16-2,29 (m, 4H), 1,94 (dt, *J*=14,6 Hz, 6,3 Hz, 2H), 1,70-1,53 (m, 2H), 1,18-1,33 (m, 24H), 0,87 (t, *J*=6,6 Hz, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ= 174,11, 131,37, 130,54, 74,131, 62,29, 54,50, 33,37, 32,43, 31,90, 31,73, 30,51, 29,69, 29,62, 29,50, 29,37, 29,33, 39,27, 29,14, 28,92, 25,75, 22,63, 14,10

Během průběhu metateze a i po ukončení byly na TLC (chloroform:methanol 50:1) pozorovány 3 výrazné skvrny. Skvrna s retenčním faktorem kolem 0,50 patřila výchozí látce. Těsně pod ní (R_f=0,45) se nacházela skvrna produktu. V úplném čele chromatogramu se nacházela skvrna odpovídající hlavnímu vedlejšímu produktu Grubbsovy metateze - (*E*)-1-Bromoktadec-4-enu. Tuto látku popisuje **obrázek 14** a NMR spektrum níže. Tato látka vznikla reakcí 5-brompent-1-enu přidaného do reakce s 13ti-uhlíkatým řetězcem z ceramidu za přítomnosti Grubbsova katalyzátoru



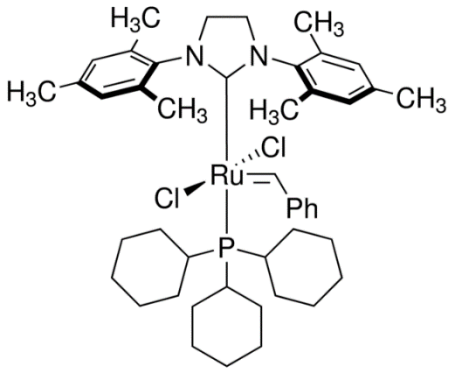
***Obrázek 13**: (E)-1-Bromoktadec-4-en. Hlavní vedlejší produkt Grubbsovy metateze*

(*E*)-1,8-Dibromokt-4-en (28)

Bezbarvá olejovitá kapalná látka, Molární hmotnost 270,00 g/mol. TLC: Rf=0,74 (chloroform:methanol 50:1).

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3): δ = 5,54-5,25 (m, 2H), 3,41 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,26-1,95 (m, 4H), 1,94-1,88 (m, 2H), 1,40-1,15 (m, 22H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl3): δ = 132,26, 127,78, 33,26, 32,50, 32,27, 31,90, 30,79, 29,67, 29,63, 29,48, 22,67, 14,10

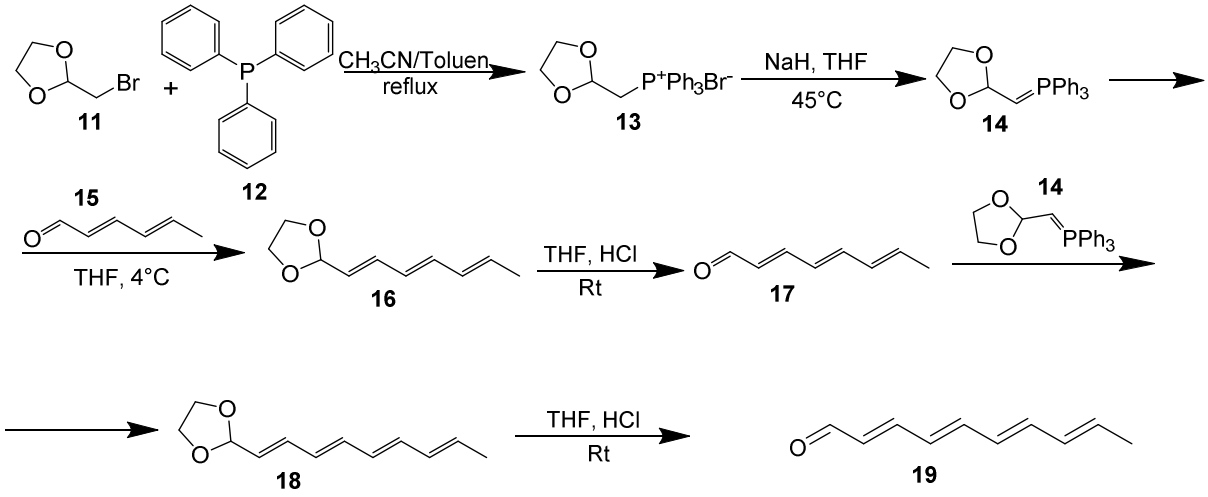


***Obrázek 14*:** *Grubbsův katalyzátor druhé generace (1,3-Bis(2,4,6-trimethylfenyl)-2-imidazolidinyliden)dichloro(fenylmethylen)(tricyclohexylfosfin)ruthenium)* [24]

3.2.4. Syntéza 4

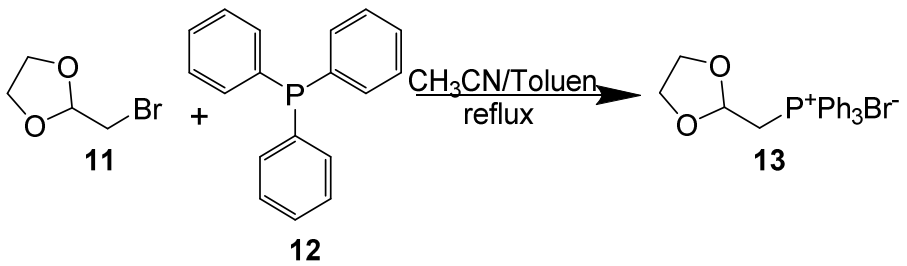
Produktem čtvrté syntézy byl klíčový reaktant pro výše uvedené syntézy (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenal **(19)**. Při syntéze se vycházelo z trifenylfosfinu **(12)** a komerčně dostupného 2-(bromomethyl)-1,3-dioxolanu **(11)**. Vzniklá fosfoniová sůl reagovala posléze s komerčně dostupným (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienalem **(15)** za vzniku (2*E*,4*E*,6*E*)-okta-2,4,6-trienalu **(17)**, který byl poté použit při obdobné reakci k tvorbě výsledného 2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalu **(19)**. Celá reakční cesta je uvedena ve schématu 4.

Syntéza 4 – Schéma 4



THF=Tetrahydrofuran **Rt**=laboratorní teplota

3.2.4.1. Příprava ((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)trifenylfosfonium-bromidu (13)

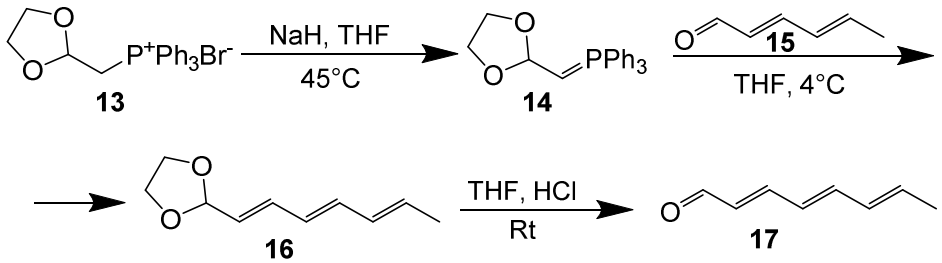


Příprava ((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)trifenylfosfonium-bromidu **(13)** byla postupně vyzkoušena třemi obměnami reakčních podmínek. V první přípravě byl smíchán 1 g (5,988 mmol) 2-(bromomethyl)-1,3-dioxolanu **(11)** a 1,57 g (5,986 mmol) trifenylfosfinu **(12)**. Reakce byla bez rozpouštědla zahřívána na cca 95°C do vzniku taveniny, a poté na stejnou teplotu míchána 48 hod. Po 48 hodinách bylo zahřívání vypnuto a směs byla zchlazena na laboratorní teplotu. Vzniklá tmavě oranžová kašovitá směs byla rozpuštěna v malém množství chloroformu, byl přidán diethylether a následně byla směs ochlazena na -10°C. Z reakce se vyloučily nažloutlé krystaly, které byly zfiltrovány a vysušeny na olejové pumpě pod hlubokým vakuem. Bylo získáno 257 mg. Výtěžek by takto činil pouhých 10%. Tudíž byly vyzkoušeny další dvě cesty přípravy.

Stejné navážky výše uvedených substancí byly rozpuštěny 1) v toluenu a 2) ve směsi toluen:acetonitril 1:1 a dále byly obě reakce zahřívány pod zpětným chladičem k varu po 48hodin. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byla rozpouštědla oddestilována na rotační vakuové odparce, vzniklá kašovitá hmota byla rozpuštěna v chloroformu a pomocí diethyletheru byly precipitovány krystaly produktu.

Čistá bílá krystalická látka ve výtěžku 63 % byla získána z reakce, kde bylo použito směsné rozpouštědlo. Tato reakce byla zopakována s navážkou 50 g **(11)** (299,4 mmol) 2-(bromomethyl)-1,3-dioxolanu a 87,5 g (299,3 mmol) trifenylfosfinu **(12)**. Stejným postupem bylo získáno 157,98 g čisté bílé krystalické látky **(13)**. Výtěžek činil 61%. Totožnost produktu byla orientačně potvrzena změřením teploty tání. Teplota tání činila 192-194°C (literatura uvádí 194-195°C [17])

3.2.4.2. Příprava (2*E*,4*E*,6*E*)-okta-2,4,6-trienalu (17)

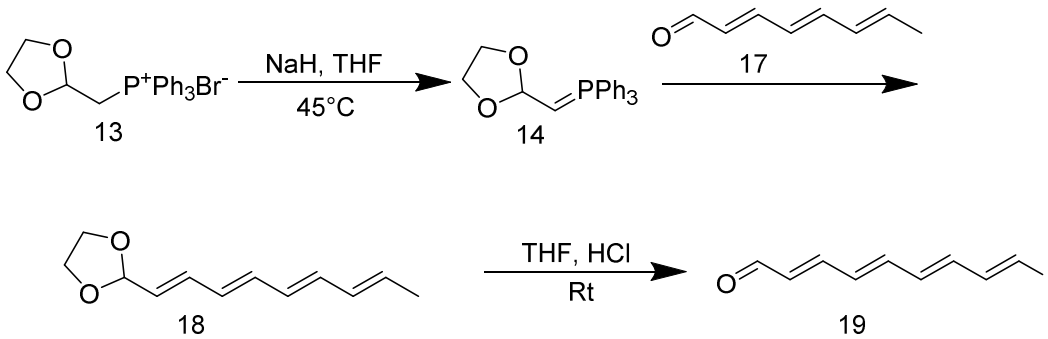


42,88 g (100 mmol) fosfoniové soli **(13)** z předchozí reakce bylo za stálého míchání pod atmosférou dusíku smíseno se 3,97 g (100 mmol) hydridu sodného (60% v parafinovém oleji). Reakční směs byla rozsuspendována v 250 ml bezvodého tetrahydrofuranu a zahřáta

na 45°C. Z reakční směsi unikal vodík a pomalu se začala barvit do tmavě oranžova. Po ustálení barvy a zastavení vývoje vodíku byla směs zchlazena na 4°C a bylo opatrně (tak aby teplota reakce nepřesáhla 10°C) přikapáno 11,14 ml (100 mmol) (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienalu **(15)** v 10 ml THF. Reakční směs přešla z oranžové na tmavě hnědou barvu. Reakční směs byla zahřívána hodinu na 50°C. Poté byla reakční směs umístěna na vakuovou rotační odparku a rozpouštědlo bylo ze směsi oddestilováno. Odparek byl rozpuštěn v hexanu a zfiltrován.

Filtrát byl opět umístěn na rotační vakuovou odparku a hexan byl odpařen. Získali jsme nažloutlou krystalickou látku **(16)**, která byla dále rozpuštěna v 100 ml THF a míchána jednu hodinu s 10 ml 12% kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl následně pomocí hydrogenuhličitanu sodného zneutralizován do neutrálního pH a poté vytřepán 3x100 ml hexanu. Spojené hexanové frakce byly vysušeny bezvodým síranem sodným a po zfiltrování zahuštěny na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 20,36 g žluté krystalické látky-(2*E*,4*E*,6*E*)-okta-2,4,6-trienalu **(17)**. Produkt byl bez dalšího čištění použit do další reakce.

3.2.4.3. Příprava (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalu (19)



42,88 g (100 mmol) fosfoniové soli **(13)** z první reakce bylo za stálého míchání pod atmosférou dusíku smíseno se 3,97 g (100 mmol) hydridu sodného (60% v parafinovém oleji). Reakční směs byla rozsuspendována v 250 ml bezvodého tetrahydrofuranu a zahřáta na 45°C. Z reakční směsi unikal vodík a pomalu se začala barvit do tmavě oranžova. Po ustálení barvy a zastavení vývoje vodíku byla směs zchlazena na 4°C a bylo opatrně (tak aby teplota reakce nepřesáhla 10°C) přidáno 20,36 g (2*E*,4*E*,6*E*)-okta-2,4,6-trienalu **(17)** v 50 ml THF. Reakční směs přešla z oranžové na tmavě hnědou barvu. Reakční směs byla zahřívána hodinu na 50°C. Poté byla reakční směs umístěna na vakuovou rotační odparku a rozpouštědlo bylo ze směsi oddestilováno. Odparek byl rozpuštěn v hexanu a zfiltrován.

Filtrát byl opět umístěn na rotační vakuovou odparku a hexan byl odpařen. Získali jsme nažloutlou krystalickou látku **(19)**, která byla dále rozpuštěna v 100ml THF a míchána jednu hodinu s 10ml 12% kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl následně pomocí hydrogenuhličitanu sodného zneutralizován do neutrálního pH a poté vytřepán 3x100 ml hexanu. Spojené hexanové frakce byly vysušeny bezvodým síranem sodným a po zfiltrování zahuštěny na rotační vakuové odparce. Poté byla látka přečištěna sloupcovou chromatografií

(mobilní fáze - hexan:ethyl-acetát 4:1). Bylo vyizolováno 4,32 g krystalické látky oranžové barvy (2E,4E,6E,8E)-deka-2,4,6,8-tetraenalu (19). Výtěžek celé reakční cesty činil 30,69 %.

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenal (19)

Žlutá krystalická látka, teplota tání 86,5 - 87,5°C (literatura uvádí 86-88°[17]), molární hmotnost: 148,20g/mol. TLC: R_f=0,64 (Hexan:Ethyl-acetát 4:1)

^{1}H NMR (500 MHz, THF-d8): δ = 9.52 (d, *J* = 7.9 Hz,1H), 7.20 (dd, *J* = 15.2 Hz, 11.2 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 14.7 Hz, 11.2 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 14.8 Hz, 11.2 Hz, 2H), 6.30-6.15 (m, 2H), 6.07 (dd, *J* = 15.2 Hz, 7.9 Hz, 1H), 5.95-5.80 (m, 1H), 1.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, THF): δ = 192.7, 152.0, 143.3, 139.4, 134.1, 132.8, 131.9, 130.6, 130.5, 18.6.

4. Výsledky a diskuze

Při snaze připravit polyenový fluorescenční ceramid byly vyzkoušeny celkem tři syntetické postupy. První dva vycházely z významného prekurzoru pro syntézu ceramidů - Garnerova aldehydu. V třetí syntéze byl jako výchozí látka použit komerčně dostupný ceramid izolovaný z biologického materiálu s 18ti-uhlíkatým acylem.

Všechny tři syntetické cesty počítaly se zabudováním polyenového fluoroforu do molekuly ceramidu. Jako fluorofor byl použit polyenový aldehyd se systémem pěti trans dvojných vazeb v konjugaci. Tento (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenal byl připraven násobnou Wittigovu reakcí. Syntéza je v této práci uvedena jako čtvrtá syntetická cesta.

V případě úspěšné syntézy polyenového ceramidu se počítalo s použitím konfokálního mikroskopu a pozorováním chování topicky podaných ceramidů při průniku kožní bariérou a objasnění mechanismu reparace poškozené lipidové matrix v rohové vrstvě kůže.

4.1. Syntéza 1

Syntéza 1 vycházela z Garnerova aldehydu, který byl podroben reakci s vinylmagnesium bromidem. Reakce probíhala za bezvodých podmínek při teplotě -78°C za přítomnosti HMPA. Rekce byla opakována celkem třikrát, přičemž až z poslední byl úspěšně izolován produkt. Výtěžnost této reakce však činila pouhých 21,57%. Dalším krokem reakce bylo odchránění *terc*-butyloxykarbonylové chránící skupiny. Tento krok byl problematický především proto, že produkt po vytřepání nepřecházel do organické fáze. Byla zvolena rekrystalizace z horkého methanolu. Podařilo se však izolovat pouze 22,13% teoretického výtěžku. Kolega z pracovní skupiny, pracující se stejnými látkami a podobným postupem vykazoval o něco vyšší výtěžky (37 % v prvním kroku a 26 % v kroku druhém). [29] Vzhledem k tomu, že tyto dva kroky díky nízkým výtěžkům rapidně snížily množství látky potřebné pro další syntézu, bylo od tohoto reakčního postupu upuštěno.

Nakolik je tato reakční cesta zatížena lidskou chybou či nevhodnými podmínkami je těžké odpovědět. Bylo by vhodné reakční postup ještě optimalizovat a pokusit se první dva kroky dovést k vyšším výtěžkům. Další možností je pokusit se provést Grubbsovu metatezi již na chráněném sfingosinu, tedy produktu vinylace Garnerova aldehydu, a odstraňovat chránící skupiny až v kroku následujícím.

4.2. Syntéza 2

Druhá syntetická cesta vycházela opět z Garnerova aldehydu. Reakcí s terminálním alkynem – 5-chlorpent-1-ynem v přítomnosti butyllithia byl v dobrém výtěžku (85,25 %) získán *terc*-butyl(4*S*)-4-(6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát. Problematickou se ukázala nezbytná redukce trojné vazby na trans dvojnou. Byly vyzkoušeny celkem tři redukční možnosti.

V první z možností byl k redukci použit bis(2-methoxyethoxy)dihydridohlinitan sodný (Red-Al). Reakce byla prováděna v bezvodém THF na místo bezvodého diethyletheru, který používal Bittman na podobných substrátech [28], ten uváděl výtěžek reakce 58%. Reakce s Red-Alem byla zkoušena celkem dvakrát. Velmi pečlivě bylo zachováno bezvodé prostředí i reakční podmínky. Přesto redukce vůbec neproběhla. Bylo tedy přistoupeno k jiným možnostem redukce.

Druhá redukce, popsaná Miurem [29] využívala jako redukční činidlo tetrahydridohlinitan lithný. Miura dosahoval výtěžku redukce 57%. Reakční postup byl napodoben, i když se náš substrát od popisovaného nepatrně lišil; nicméně v našem případě redukce opět neproběhla. Miura však přistupuje k redukci až po odstranění *terc*-butyloxykarbonylové chránící skupiny, v našem případě byla reakce prováděna bez odchránění. Otázkou je, jestli tento postup mohl reakci natolik pozměnit, že by redukce neproběhla vůbec. Domnívám se, že přítomnost chránící skupiny nebude mít na tuto redukce až tak zásadní vliv.

Třetím vyzkoušeným redukční postupem byla redukce kovovým lithiem v amoniaku. Tato reakce se běžně provádí v kapalném ethylaminu, ten se však přestal v malém balení vyrábět, proto jsme se jej rozhodli nahradit amoniakem. Lithium bylo rozdrobněno na asi 0,5cm široké a dlouhé kousky. Rozdrobněné lithium bylo nutné před použitím reaktivovat. K reaktivaci došlo krátkým ponořením do methanolu, poté byly kousky lithia rychle opláchnuty v diethyletheru a hexanu. Po reaktivaci bylo ihned umístěno do vyžíhané baňky, která byla umístěna na hluboké vakuum k odstranění veškeré zbytkové vlhkosti. Baňka byla posléze zaplněna argonem a podchlazena na -78°C. Do podchlazené baňky byl poté vháněn plynný amoniak. Amoniak bylo nutné nejprve vhánět do promývačky s pevným hydroxidem sodným, aby se zabránilo kontaminaci reakce případnou zbytkovou vlhkostí. Amoniak v reakci okamžitě kapalněl a začal rozpouštět lithium za vzniku temně modrého roztoku. Po rozpuštění veškerého lithia byl přívod amoniaku zastaven. Reakce byla ještě hodinu pozorována, abychom se ujistili, že temně modré zbarvení nezmizí. Až poté byla do reakce přidána látka k redukci. Po ukončení redukce byla změřena hmotností spektra, která redukci potvrdila v pouze velice malém poměru, oproti množství nezredukované látky. Tento postup se však zdá být poměrně nadějný, jen je nezbytné reakční podmínky ještě dostatečně optimalizovat.

Vzhledem k tomu, že se i přes veškeré snažení nepodařilo získat produkt s dvojnou vazbou, nebylo možné v reakční cestě nadále pokračovat.

4.3. Syntéza 3

Syntéza 3 se zakládala na principu Grubbsovy metateze, kdy ke komerčně zakoupenému ceramidu byl přidán Grubbsův katalyzátor a 5-brompent-1-en. Jde tedy o principiálně stejnou reakci, jako byla plánována na terminálním alkenu v postupu 1, jenž se však nepodařil připravit v dostatečném množství, proto jsme přistoupili k metatezi přímo na ceramidu. Při této metatezi byl 13uhlíkatý zbytek ve sfingosinové části ceramidu nahrazen výše uvedeným bromalkenem. Reakce proběhla s výtěžkem 46,79%. Dále měl být tento

produkt ochráněn silylací. Reakce vedoucí k silylaci proběhla, ale z nedostatku času nedošlo k přečištění látky, proto není v této práci tento krok uveden jako dokončený.

4.4. Syntéza 4

Čtvrtá syntéza popsaná v této práci sloužila k přípravě klíčového polyenového fluoroforu (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalu. Flurofor měl být zaveden v posledních krocích všech tří syntéz analog ceramidu s terminálním ylidem. Zavedení tohoto fluroforu až v samých závěrech syntéz bylo zvoleno vzhledem k předpokládané nestabilitě a citlivosti na světlo výsledného produktu

Během syntézy 4 byly vyzkoušeny 3 postupy pro přípravu fosfoniové soli, reakce v tavenině, toluenu a směsi toluenu s acetonitrilem. Nejvýhodnější se ukázala reakce, kde jako prostředí byl použit toluen s acetonitrilem v poměru 1:1. Výtěžek této reakce činil 61,12 %.

Další reakční kroky nepřinesly žádný problém a byl tak získáno 4,32 g 2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalu, jehož struktura byla ověřena NMR analýzou. Výtěžek reakční cesty byl 30,69 %.

5. Závěr

V této práci jsme prozkoumali syntetické přístupy k polyenovému fluorescenčnímu ceramidu. Při třech syntézách byly připraveny prekurzory pro jeho přípravu a je možné v syntéze dále pokračovat. Nezbytně nutné bude dále optimalizovat reakční podmínky syntéz. Optimalizací by mělo dojít ke zvýšení výtěžku reakcí a možnosti pokračovat v zastavených syntézách.

Pro další snahy připravit ceramid s polyenovým fluoroforem bude zřejmě nejlepší použít Grubbsovu metatezi jak je tomu v **syntéze 3** nebo optimalizovat redukci trojné vazby a pokračovat v krocích nastíněných v **syntéze 2**.

6. Seznam použité literatury

1. **Goñi, F. M.; Alonso, A**. Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta, 1758, 2006, 1902–1921*

2. **Ruvolo, P. P.** Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites, *Pharmacological Research, 47, 2003, 383–392*

3. **Hannun, Y. A.; Obeid, L. M**. Ceramide: a intracellular signal for apoptosis. *Trends in biochemical sciences, 20, 2, 1995, 73-77*

4. **van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A**. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta, 1841, 2014, 295–313*

5. **Vávrová, K.; Hrabálek, A**. Role ceramidů v kůži. *Praktické Lékárenství, 2, 2006, 55-58*

6. **Bouwstra, J. A.; Cheng, K.; Gooris, G. S.; Weerheim, A.; Ponec, M.** The role of ceramides 1 and 2 in the stratum corneum lipid organisation. *Biochimica et Biophysica Acta, 1300, 1996, 177-186*

7. **Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.** Synthesis and Structure-Activity Relationships of Skin Ceramides. *Current Medicinal Chemistry, 17, 2010, 2301-2324*
8. **Coderch,L.; López, O.; de la Maza, A.; Parra, J. L.** Ceramides and Skin Function, *American Journal of Clinical Dermatology, 4, 2, 2003, 107-129*

9. **Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G.S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J.A.** Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of Lipid Research, 53, 2012, 2755-2766*

10. **Choi, J. M.; Maibach, H. I.** Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *American Journal of Clinical Dermatology, 6, 4, 2005, 215-223*

11. **Matsumoto, M**. Difference in Ceramide Composition between „Dry“ and „Normal“ Skin in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta dermato-venerologica, 79, 1999, 246-247*

12. **Macheleidt, O.; Kaiser, W. H.; Sandhoff, K**. Deficiency of Epidermal Protein-Bound ω -Hydroxyceramides in Atopic Dermatitis. *The Journal Of Investigative Dermatology, 119, 2002, 166-173*

13. **Marsella, R.; Genovese, D.; Gilmer, L.; Ahrens, K.; Gatto, H.; Navarro, C.** Investigations on the Effects of a Topical Ceramides-Containing Emulsion (Allerderm Spot on) on Clinical Signs and Skin Barrier Function in Dogs with Topic Dermatitis: a Double-Blinded, Randomized, Controlled Study. *The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, 11, 2, 2003, 110-116*

14. **Kuerschner, L.; Ejsing, C. S.; Ekroos, K.; Shevchenko, A.; Anderson, K. I.; Thiele, C.** Polyene-lipids: A new tool to image lipids. *Nature Methods, 2, 2005, 39-45.*

15. **Maier, O.; Oberle, V.; Hoekstra, D.** Fluorescent lipid probes: some properties and applica-tions (a review). *Chemistry and Physics of Lipids, 116, 2002, 3-18.*

16. **Marks, D. L.; Singh, R. D.; Choudhury, A.; Wheatley, C. L.; Pagano, R. E**. Use of fluorescent sphingolipid analogs to study lipid transport along the endocytic pathway. *Methods, 36, 2005, 186–195*

17. **Říha, M.** Syntéza prekurzorů fluorescenčního polyenového ceramidu. *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011.*

18. **Novotný, J.; Pospěchová, K.; Hrabálek, A.; Čáp, R.; Vávrová, K**. Synthesis of fluorescent C24-ceramide: Evidence for acyl chain lenght dependent differences in penetration of exo-genous NBD-ceramides into human skin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19, 2009, 6975-6977*

19. **van Meer, G.; Liskamp, R. M.** Brilliant lipids. *Nature Methods, 2, 2005, 14-15.*

20. **Hornillos, V.; Tormo, L.; Amat-Guerri, F.; Acuna, A. U**. Synthesis and spectral properties of fluorescent linear alkylphosphocholines labeled with all-(E)-1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 216, 2010, 79–84*

21. **Sklar, L. A.; Hudson, B. S.; SImoni, R. D.** Conjugated Polyene Fatty Acids As Membrane Probes: Preliminary Characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 5, 1975, 1649-1653*

22. **Grubbs, R. H.** Olefin-Metathesis Catalysts for the Preparation of Molecules and Materials (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition, 45, 2006, 3760 – 3765*

23. **Clayden, J.; Geeves, N.; Warren, S.** Alkene (olefin) metathesis. *Organic Chemistry, 2, 2012, 1074-1075*

24. http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/technology-spotlights/metathesis.html 11.8.2014

25. **Trnka, M.; Grubbs, R. H.** The Development of L_2X_2Ru=CHR Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story. *Accounts of Chemical Research, 34, 2001, 18-29*

26. **Yamamoto, T.; Hasegawa, H.; Hakogi, T.; Katsumura, S.** Versatile Synthetic Method for Sphingolipids and Functionalized Sphingosine Derivatives via Olefin Cross Metathesis, *Organic Letters, 8, 24, 2006, 5569-5572*

27. **Drozen, T.** Příprava analogů ceramidů odvozených od 5C sfingosinu *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013.*

28. **Lu, X.; Bittman, R**. Synthesis of a Photoactivatable (2S,3R)-Sphingosylphosphorylcholine Analogue, *The Journal of Organic Chemistry, 70, 2005, 4746-4750*

29. **Miura, T.; Kajimoto, T.; Jimbo, M.; Yamagishi, K.; Inokuchi, J. Ch.; Wong, H. Ch.** Synthesis and evaluation of Morpholino- and Pyrrolidinosphingolipids as Inhibotors of Glucosylceramide Synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 6, 1998, 1481-1489*

30. **Chun, J.; Li,G.; Byun, HS.; Bittman, R.** Synthesis of new trans double-bond sphingolipid analogues: Delta(4,6) and Delta(6) ceramides. *The Journal of Organic Chemistry, 8, 67, 2002, 2600-2605*

31. **Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R.** Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta, 1841, 2014, 422-434*