

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

Diplomová práce

**SYNTÉZA ANALOGŮ CERAMIDŮ S RŮZNOU DÉLKOU
SFINGOSINU A HODNOCENÍ JEJICH VLIVU NA KOŽNÍ BARIÉRU**

Barbora Školová

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

Hradec Králové 2010

Děkuji tímto své školitelce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za pomoc a cenné rady při vypracování této diplomové práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.

Barbora Školová
V Hradci Králové 2010

OBSAH

Abstrakt	5
Abstrakt	6
1. Úvod a cíl práce	8
2. Teoretická část	9
2.1. Stavba kůže	9
2.2. Stratum corneum	9
2.3. Ceramidy	10
2.4. Strukturní typy ceramidů	10
2.5. Biosyntéza ceramidů a vznik lipidových lamel SC	12
2.6. Uspořádání lipidů SC	12
2.7. Nedostatek ceramidů ve vztahu ke kožním onemocněním	13
2.8. Transdermální permeace	14
2.9. Způsoby přípravy analogů ceramidů	15
3. Experimentální část	19
3.1. Chemikálie a přístroje	19
3.2. Syntéza	19
3.3. Permeační pokusy	32
3.4. Stanovení vzorků HPLC	35
4. Výsledky a diskuze	37
5. Závěr	43
6. Seznam zkratk	44
7. Literatura	45

Abstrakt

Ceramidy představují komplexní skupinu lipidů, přirozeně se vyskytujících v nejsvrchnější vrstvě epidermis, stratum corneum (SC). Tvoří hlavní složku mezibuněčné hmoty a jsou zodpovědné za bariérové vlastnosti kůže. S poklesem obsahu a změnami ve složení ceramidů souvisí onemocnění jako atopická dermatitida či psoriáza, která vedou ke snížení ochranné funkce kůže.

Přestože je význam ceramidů znám, vztah mezi strukturou a účinkem na její bariérovou funkci stále není zcela objasněn. Dřívější studie naznačují vliv délky acylového řetězce na prostupnost kůže. Ukazuje se, že ceramidy s krátkým acylem ochranné vlastnosti narušují.

Permeačním pokusům předcházela příprava analogů ceramidů s patnáctiuhlíkatým řetězcem, zastupujícím sfingosinovou část, a acylovou částí o délce 2, 4 a 6 uhlíků. Výchozí látkou syntézy byl N-chráněný methylester L-serinu, jenž byl ochráněn za vzniku cyklického acetalu a následně byl ester redukován na aldehyd. V přítomnosti HMPA došlo na karbonylovém uhlíku k navázání 1-alkynu a trojná vazba byla následně redukována na *trans*-dvojnou. Po odstranění chránících skupin byla aminoskupina acylována.

Vliv připravených produktů na permeabilitu kůže byl hodnocen na prasečích kůžích ve Franzových difúzních celách pomocí dvou modelových léčiv – theofylinu a indometacinu. Donorové vzorky představovaly suspenze theofylinu (5%) či indometacinu (2,5%) s přidavkem ceramidu (1%) v 60% propylenglykolu, kontrolní vzorky neobsahovaly ceramid. Jako akceptorová fáze pro stanovení léčiva byl použit fosfátový pufr. Analýza odebraných vzorků byla provedena metodou HPLC.

Vyhodnocení působení zkoumaných analogů ceramidů na prostupnost kůže potvrdily zásah do bariérové funkce kůže. Maximálního zvýšení permeability bylo dosaženo aplikací analogu se čtyřuhlíkatým acylem, nejvyšší koncentrace léčiva zůstávají v kůži s podáním ceramidu s délkou acylu 6 uhlíků. Překvapivé bylo zjištění, že patnáctiuhlíkaté analogy sfingosinu vykazovaly zvýšení propustnosti i koncentrace léčiva v kůži ve srovnání s deriváty s délkou sfingosinu 12 a 18 uhlíků.

Výsledky práce se shodují s očekávaným vlivem analogů ceramidů s krátkým acylem, nicméně vliv délky řetězců, izomerie na dvojnou vazbu a další strukturální znaky zůstávají předmětem hledání vztahu mezi strukturou a účinkem ceramidů na bariérové vlastnosti kůže.

Abstract

Ceramides are a complex group of lipids, naturally occurring in the uppermost layer of the epidermis, in the stratum corneum (SC). They constitute a major component of extracellular matrix and they are responsible for the skin barrier properties. Diseases such as atopic dermatitis or psoriasis are associated with the decline in content and changes in the composition of ceramides, which lead to the reduction in the protective functions of the skin.

Although the importance of ceramides is known, the relationship between their structure and effect on the barrier function is not yet fully elucidated. Earlier studies indicate that the length of ceramide acyl chain affects the skin permeability. It appears that ceramides with short acyl lose the protective properties.

First, I have prepared a series of analogues of ceramides with fifteen carbon atoms chain in the sphingosine part and the acyl part of a length of 2, 4 and 6 carbons. Starting substance of the synthesis was N-protected L-serine methyl ester, which was further protected by the formation of a cyclic acetal and subjected to the reduction of the ester to aldehyde. The resulting aldehyde reacted with 1-alkynide in the presence of HMPA. The triple bond was subsequently reduced to a *trans*-double bond by lithium in ethylamine. After deprotection of the functional groups, the sphingosine analogue was acylated using succinimidyl esters of the pertinent acids to yield the target ceramides.

The effects of the prepared ceramides on the skin permeability were evaluated on pig skin in Franz diffusion cells using two model drugs – theophylline and indomethacin. Donor samples contained suspension of theophylline (5%) or indomethacin (2.5%) with the addition of ceramide (1%) in 60% propylene glycol, control samples did not contain ceramide. As the acceptor phase for the determination of drug was used phosphate buffer saline. The amount of the model drugs in the acceptor phase samples and in the skin was determined by HPLC.

The results confirmed our hypothesis that short chain ceramides decrease the barrier function of skin. Maximum increase in permeability was achieved by applying the analogue with 4-carbon acyl chain, the highest concentration of the drug in the skin was observed after the application of ceramide with 6-carbons acyl chain. Surprisingly, these ceramides containing 15-carbon sphingosine generally caused greater permeability increase than those with 12 and 18-carbon sphingosine.

The results are consistent with our hypothesis about the impact of the short chain ceramide analogues on the skin permeability. Nevertheless, the role of the sphingosine chain length, double bond geometry and other structural features in the ceramide molecule warrants further investigation.

1. Úvod a cíl práce

Ceramidy tvoří hlavní složku mezibuněčné hmoty nejsvrchnější vrstvy epidermis, stratum corneum. Ta představuje bariéru před vnějším prostředím a zároveň se podílí na udržování fyziologických funkcí organismu, protože zabraňuje ztrátám vody a dalších látek. Nedostatek ceramidů v kůži je spojen s kožními onemocněními - atopickou dermatitidou, psoriázou, různými formami ichthyózy, akné. Přestože struktura a význam ceramidů v kůži je znám, vztah mezi jejich strukturou a účinky na bariérové vlastnosti není zcela objasněn.

Dřívější studie naznačují vliv délky acylového řetězce ceramidů na prostupnost kůže.^{1,2} Cílem mé diplomové práce byla syntéza analogů ceramidů se zkrácenou délkou řetězce sfingosinu a krátkými acyly o délce řetězce 2, 4 a 6 uhlíků a hodnocení jejich vlivu na bariérovou funkci kůže.

2. Teoretická část

Primární funkcí kůže je ochrana organismu před okolními vlivy fyzikálního, chemického a biologického původu (záření, mechanické poškození, proniknutí toxických látek, alergenů či mikroorganismů) a zároveň zachování jeho fyziologického stavu (regulace ztrát tepla, vody aj. látek). Kůže tedy představuje bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím.

2.1. Stavba kůže

Kůže je tvořena dvěma vrstvami:

- vnější, nevaskularizovanou (epidermis) a
- vnitřní (dermis), která je bohatě prokrvena a inervována a navazuje na podkožní vazivo.

Šířka epidermis se pohybuje okolo 100-150 μm a skládá se ze čtyř vrstev: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum corneum (SC). Její buňky zastupují diferenciační stádia vzniklá z kmenových buněk na hranici s dermis, migrující k povrchu kůže. Buňky postupně mění tvar, strukturu i složení, dochází k jejich zplošťování, ubývání kyslíku a živin, hromadění keratinu a zvyšování podílu lipidů. Výsledkem tohoto procesu, zvaného keratinizace, je vrstva 18-21 buněk (10-20 μm) zcela na povrchu kůže, zvaná stratum corneum.³ Nepotřebné odumřelé buňky se ve skupinkách nebo vrstvách odlupují, hovoříme o deskvamaci. Obnovení epidermis (keratinizace) trvá 30 dní, z toho 15 dní vzniká SC.⁴

2.2. Stratum corneum

Vlastní kožní bariéru představuje SC (syn. rohová vrstva). Tato vrstva je složena z plochých buněk (**korneocytů**), které jsou pevně obklopeny **lipidovou matrix** v lamelovém uspořádání.

Korneocyty pochází z bazální vrstvy, jsou vysoce nerozpustné a velmi odolné vůči působení chemikálií. Mají degradované organely a jsou téměř beze zbytku vyplněny keratinem. Na soudružnosti SC se navíc podílí desmosomy, proteinové spojky mezi jednotlivými buňkami.⁵

Vlastnosti SC jsou dány zejména chemickým složením této vrstvy: je zde 75-80 % proteinů, 5-15 % lipidů, zbytek tvoří další organické sloučeniny a voda (aminokyseliny, močovina, laktamy).³ Proteiny jsou zastoupeny především v korneocytech (asi 70 % α -keratinu, 10 % β -keratinu), dále jako enzymy a jiné peptidické struktury (15 %).

Lipidy s malým množstvím vody vyplňují mezibuněčný prostor (přibližně 20 % SC). Vytváří v něm lamely, složené z několika dvojvrstev, souběžné s povrchem kůže. Uspořádání v lamele vychází ze složení a struktury přítomných lipidů. Hlavní složkou této mezibuněčné lipidové hmoty je přibližně ekvimolární směs ceramidů, mastných kyselin a cholesterolu, dále jsou přítomny organické estery cholesterolu a cholesterol-sulfát. Fosfolipidy zde, na rozdíl od jiných biologických membrán, nejsou téměř přítomny.³

2.3. Ceramidy

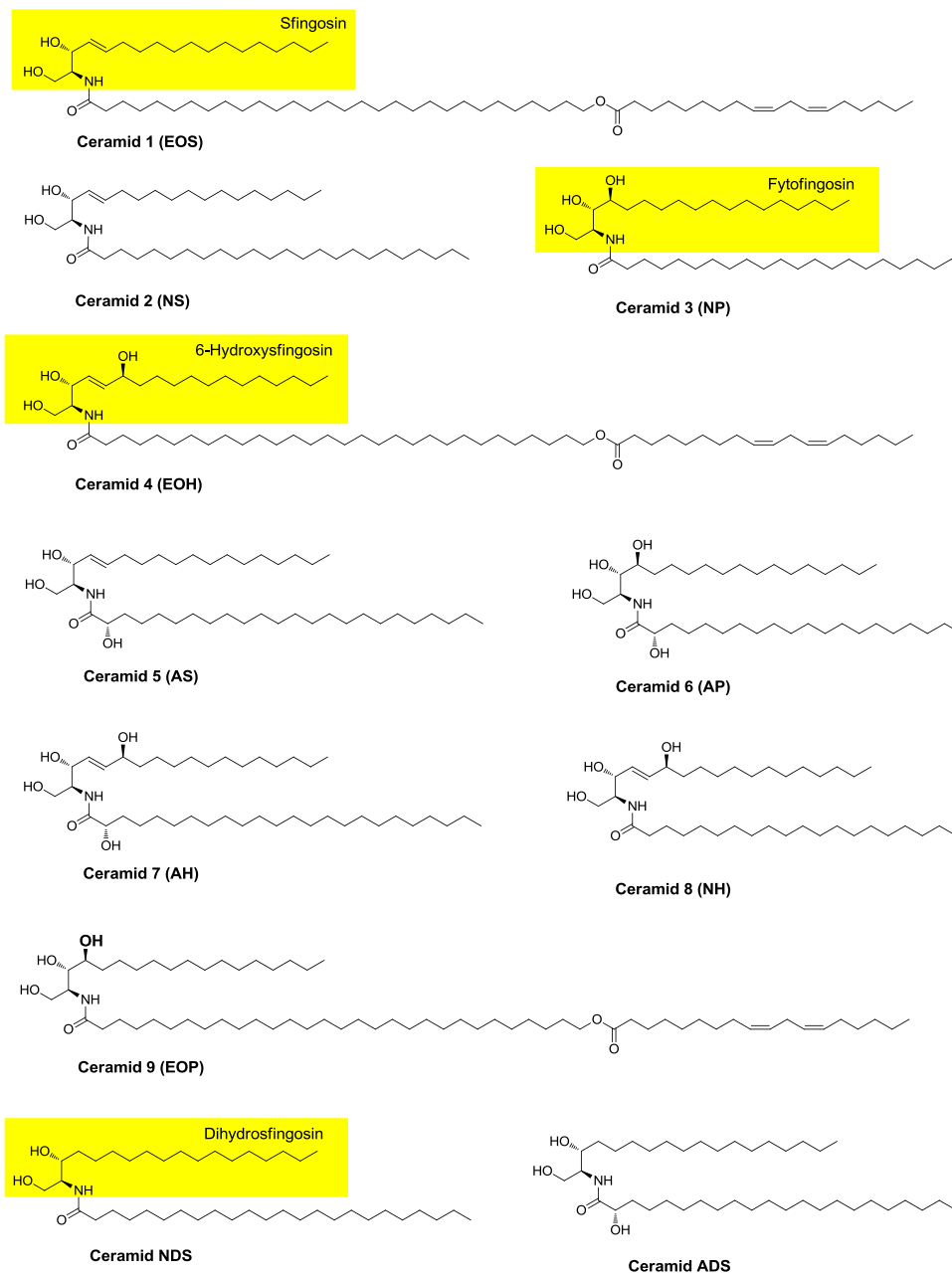
Schopnost SC zamezit prostupu látek z vnějšího prostředí do organismu a ztrátám vody je pravděpodobně určena složením intercelulárních lipidů a jejich výjimečným uspořádáním. V roce 1975 bylo prokázáno, že hlavní složkou bariérových lipidů jsou ceramidy.⁶

Ceramidy patří mezi sfingolipidy. Bazickou část molekuly reprezentuje aminoalkohol - sfingosin (S), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) a dihydrosfingosin (DS). Na jeho primární aminoskupinu v poloze 2 je amidicky vázaná mastná kyselina s délkou řetězce 16-34 uhlíků (nejčastěji 22 a 24C⁶), která je buď nesubstituovaná (N) nebo může obsahovat hydroxyskupinu v polohách α (A) nebo ω (s esterově vázanou kyselinou linolovou, EO).

2.4. Strukturní typy ceramidů

Kombinací čtyř různých sfingoidních bází a tří typů acylu vzniká 12 dosud známých, v lidské kůži se přirozeně vyskytujících, strukturních typů ceramidů (Obr. 1). Ty

byly původně značeny arabskými číslicemi podle pořadí eluce při chromatografii.^{7, 8} Při zařazení nových ceramidů však tato nomenklatura nevyhovovala, proto je dnes více využíváno označování dle Motty⁹, pomocí kombinace písmen (výše uvedených v závorkách).



Obr. 1. Struktura 12-ti dosud známých typů ceramidů v lidské kůži s původní i Mottovou nomenklaturou.

2.5. Biosyntéza ceramidů a vznik lipidových lamel SC

Během procesu keratinizace dochází v endoplazmatickém retikulu k reakci palmitoylkoenzymu A a serinu, který je zdrojem dusíku a kyslíku v molekule sfingosinu. Následnou acylací jeho aminoskupiny mastnou kyselinou vzniká ceramid.¹⁰ Vzniklé ceramidy jsou skladovány v lamelárních granulech ve formě prekurzorů, glukosylceramidů a sfingomyelinů, které představují méně lipofilní transportní formu.

Lamelární granula jsou membránou opatřené útvary, obsahující disky, tvořené lipidickou dvouvrstvou, vyskytují se ve stratum spinosum.¹¹

V pozdní fázi diferenciaci keratinocyty (na rozhraní stratum granulosum a SC) migrují granula k membráně buňky, aby s ní splynula za uvolnění lipidových disků do mezibuněčného prostoru. Metabolizaci prekurzorů zajistí současně uvolněné enzymy (glukocerebrosidáza, sfingomyelináza), kromě ceramidů se vně dostanou i mastné kyseliny a cholesterol.⁴

Jednotlivé lipidové disky fúzí v lamelovou strukturu lipidové matrix. Na vnitřní straně korneocyty se v konečných fázích keratinizace ukládá silná proteinová vrstva, z jejíž vnější strany se kovalentně připojí monovrstva ceramidů, která určuje orientaci lamel.⁴ Tato monovrstva vzniká z části ceramidů typu EO, tedy ω -linolyloxy derivátů, ze kterých se odštěpí kyselina linolová a vzniklý ω -hydroxyceramid se kovalentně naváže na zbytek kyseliny glutamové na povrchu korneocyty.

2.6. Uspořádání lipidů SC

Podobně jako jiné lipidické struktury, např. fosfolipidy, jsou molekuly ceramidů složeny z polární hlavy a dvou hydrofobních řetězců. V porovnání s fosfolipidy je však polární hlava výrazně menší a hydrofobní řetězce podstatně delší, což umožňuje těsnější uspořádání a zároveň vytvoření vzájemně propojených několikavrstevných lamelárních struktur.^{6, 12}

V organizaci lamely hrají ceramidy významnou roli. Na sfingosin (nebo jeho derivát) je navázána ω -hydroxykyselina s 30-34 uhlíky, jejíž hydroxyl je esterifikován esenciální kyselinou linolovou (ceramid EOS). Tento strukturní typ vytváří jakousi matici, okolo které se organizují ostatní ceramidy, ve kterých kyselinová část čítá 20-24 uhlíků.

Kyselina behenová (C₂₂) a lignocerová (C₂₄) jsou nejčastějšími zástupci acylových částí, v menší míře jsou zastoupeny kyselina palmitová, stearová a další.³

Elektronověmikroskopickou analýzou byly pozorovány opakující se jednotky, sestávající se ze světlých proužků ve sledu široký – úzký – široký, ve skupince po třech, šesti (nejčastěji), devíti i dvanácti. V širokých pásech, na koncích mezibuněčného prostoru, se vyskytují lipidy kovalentně vázané na buněčný povrch (ceramidy s dlouhými řetězci). Úzké pruhy, tzv. molekulové zipy, obsahují cholesterol a jeho deriváty a zbytky kyseliny linolové^{12, 13} Přítomný cholesterol funguje jako stabilizátor lipidických struktur.⁴

2.7. Nedostatek ceramidů ve vztahu ke kožním onemocněním

Souvislost mezi kožními onemocněními a změnami ve složení bariérových lipidů je těžké dokázat, neboť v tomto vztahu existuje řada proměnných. Nicméně u většiny chorob vykazujících oslabenou bariérovou funkci, je průkazné současné snížení celkového obsahu ceramidů.¹⁴

Příčina poškození kůže může být akutní, kontakt s organickými rozpouštědly nebo agresivními detergenty může vyvolat podobně jako poranění ztrátu ochranné funkce bez zánětlivých projevů. Chronická onemocnění nesou znaky suché, drsné až šupinaté kůže, typické exacerbace v závislosti na vnějších i vnitřních podmínkách zvyšují množství penetrujících alergenů, dráždivých látek a mikrobů a podporují tak zánětlivé procesy.

Složení lipidické bariéry ovlivňuje věk, pohlaví, tělesná konstituce, životní styl (stres), prostředí, roční období a UV záření. U stárnoucí kůže byl popsán nižší obsah ceramidů a snížená schopnost regenerace. Ve věkové kategorii 41-50 let bylo zaznamenáno poloviční množství ceramidů než u skupiny 21-30 let, nejvýraznější změny byly patrné na obličeji.⁴ Sledování hladin lipidů odhalilo pokles v zimním období v porovnání s jarem a létem.¹⁵ Zastoupení ceramidů ve SC ovlivňují u žen hormonální změny.¹⁶ Vliv UV záření závisí na dávce. V nízkých dávkách dochází ke zvyšování množství ceramidů ve SC a ke zlepšení její bariérové funkce, čehož se využívá při fototerapii atopických pacientů. Vyšší dávky způsobují pokles ceramidů, poškození bariéry a vyvolávají zánět.¹⁷

Mezi nejčastěji se vyskytujícími onemocněními souvisejícími s nedostatkem ceramidů patří atopická dermatitida, psoriáza, různé formy ichtyózy i akné.

- *Atopická dermatitida (AD)* je zánětlivé kožní onemocnění s imunologickým základem provázené poškozením kožní bariéry, která umožňuje vstup alergenů, dráždivých látek a mikrobů. Tyto iritanty vyvolávají zánět, jehož další rozvoj stav kožní bariéry zhoršuje, hovoří se o tzv. bludném kruhu AD.⁴ Onemocnění doprovází zvýšení transepidermální ztráty vody a snížení hydratace kůže. U pacientů s AD byl objeven enzym glukosylceramid-sfingomyelin deacyláza, degradující prekurzory ceramidů, což vede ke sníženému množství ceramidů ve SC. Další možnou příčinou je snížená aktivita sfingomyelinázy, produkující ceramidy a zvýšený výskyt bakterií produkujících ceramidázu. Tyto enzymatické změny mají za následek celkový úbytek ceramidů, změny v jejich složení, výskyt abnormálních typů a zásah do uspořádání lamel.^{4, 14, 18}
- *Psoriáza (lupénka)* charakterizovaná hyperproliferací a poruchami diferenciací keratinocytů je onemocněním s genetickou predispozicí. Příčina chronického zánětu není známá, podobně jako u AD je zaznamenán nedostatek ceramidů, obzvláště obsahujících fytosfingosin. Možnými příčinami poklesu je nižší exprese glukocerebrozidázy, snížená syntéza ceramidů ze serinu či pokles množství prosaposinu, prekurzoru sfingolipidy-aktivujícího proteinu.^{4, 14, 18}
- *Ichtyózy* zastupují rozsáhlou skupinu dědičných i získaných hyperkeratóz, jejichž příčinou může být snížená deskvamace, zvýšená proliferace keratinocytů nebo poruchy metabolismu lipidů SC, které je typicky ztlustělé a šupinaté.

2.8. Transdermální permeace

I když je kůže mimořádně odolnou bariérou, existují v ní místa, která představují cesty pro průnik xenobiotik. Jednou z možností je průchod látek přes vlasové folikuly, potní a mazové žlázy. Ty však zaujímají pouze 0,1 % kožního povrchu a průnik přes ně je vyhraněn pouze pro omezený počet sloučenin, např. látky s vysokou molekulovou hmotností.¹³

Další dvě cesty vedou přes SC:

1. intracelulární (transcelulární) přes lipidovou matrix i korneocyty
2. intercelulární (paracelulární) lipidovou matrix mezi korneocyty

O permeabilitě sloučeniny rozhodují její fyzikálně-chemické vlastnosti, především velikost molekuly a její lipofilita.¹⁹ Experimentálně bylo prokázáno, difúzní cesta je mnohem delší, než je tloušťka SC (cca 20 μm), přibližně byla vypočtena na 500 μm . To nasvědčuje prostupu látek právě klikatými mezibuněčnými prostory. V dalších studiích pak bylo prokázáno, že intercelulární cesta je pro mnoho látek s širokým spektrem polarit nejčastější.²⁰

Transcelulární přechod je obtížnější, usnadněn může být zvýšením obsahu vody ve SC, kterou na sebe navážou polární skupiny korneocytárních aminokyselin. Buňka nabobtná, dojde rozvolnění a snížení viskozity lipidů a tím i k částečnému porušení integrity lamel.³

Přestože difundující molekula musí překonat velmi heterogenní prostředí kožní bariéry, může být její průnik popsán, podobně jako u homogenních membrán, Fickovým difúzním zákonem.²¹

2.9. Způsoby přípravy analogů ceramidů

Nabízí se několik možností syntézy ceramidů. Klíčovým krokem je příprava sfingoidní báze, s níž se pojí možné komplikace jako povrchová aktivita nebo epimerizace meziproductů. Acylaci připraveného aminoalkoholu lze provést použitím aktivních derivátů kyselin, např. sukcinimidylesteru, halogenidu nebo anhydridu kyseliny.

U prvních syntéz ceramidů není kladen důraz na selektivní přípravu diastereoizomerů ani na uspořádání na *trans*-dvojně vazbě. V 70. letech byla představena syntéza sfingosinu, vycházející z chirálních derivátů cukrů. V následujících letech se pozornost věnovala přípravě stereoselektivních látek, jejichž uspořádání v molekule zajistíme úpravou reakčních podmínek nebo jako výchozí látky použijeme chirální sloučeniny.

V roce 1958 představila pracovní skupina Shapira syntézu, založenou na navázání fenyldiazoniové soli na substituovaný ester kyseliny acetyloctové (**2**) v bazickém prostředí a následné redukci dusíkaté skupiny zinkem v kyselém prostředí a navazující redukci NaBH₄. Produktem je diastereoisomerická směs (**4**) 3:2 (erythro:threo), která byla po krystalizaci a deacylaci redukována LiAlH₄ na sfingosin.^{22, 23} Viz schéma 1.

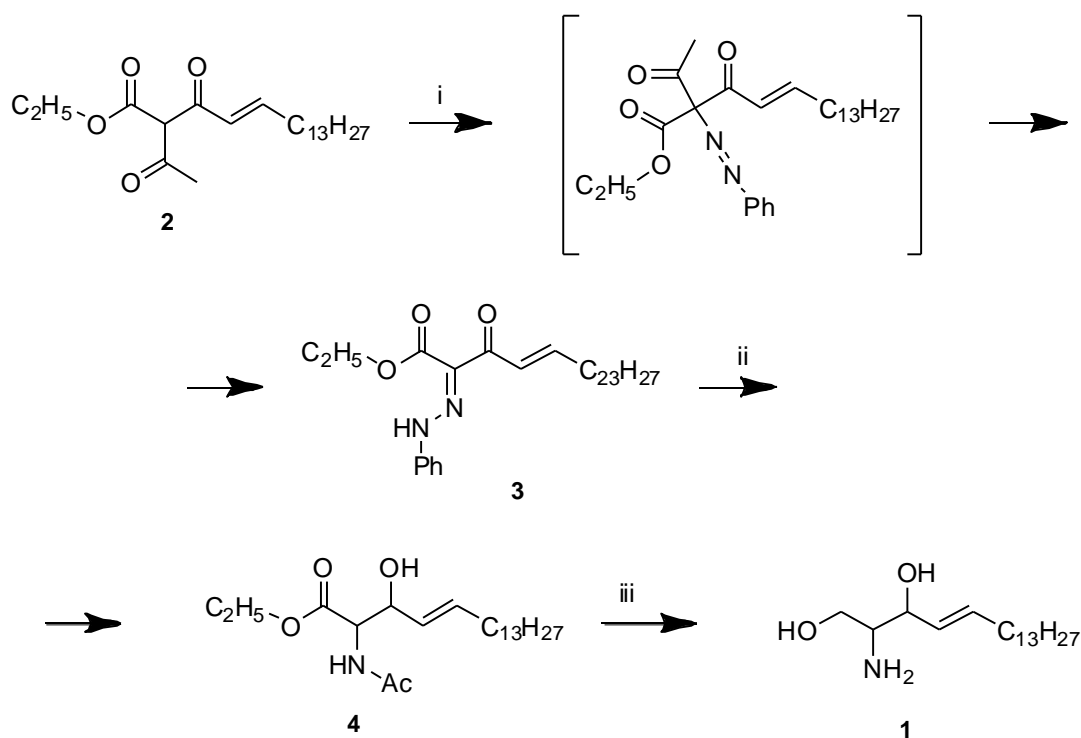


Schéma 1., kde R= -C₁₃H₂₇, (i) NH₄Cl/PhN₂Cl; (ii) a) Zn/AcOH/Ac₂O, b) NaBH₄, c) krystalizace; (iii) a) HCl, b) LiAlH₄.

Rozdílný postup zvolili v roce 1957 Grob a Gadiant, vycházející z kondenzace nitroethanolu (**7**) a hexadecynalu (**8**). Redukce nitroskupiny zinkem v kyselém prostředí předcházela redukci trojné vazby LiAlH₄.^{22, 24} Viz schéma 2.

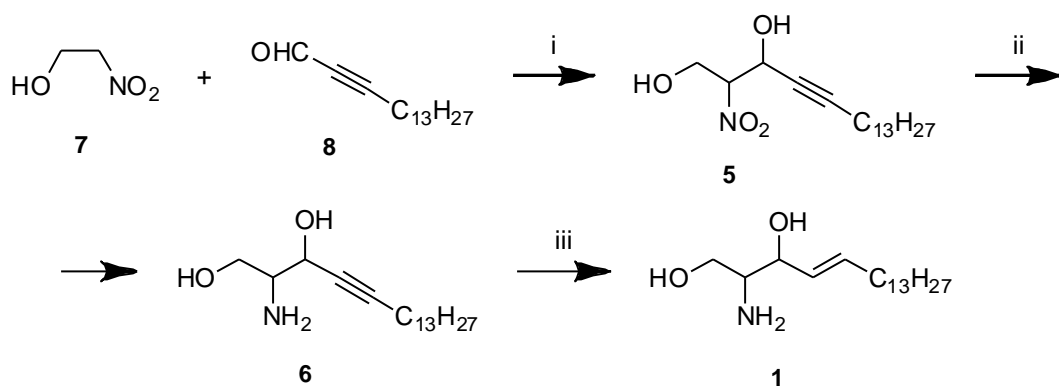


Schéma 2. (i) $K_2CO_3/MeOH$; (ii) HCl/Zn ; (iii) $LiAlH_4$.

Cukerné deriváty využili jako první k přípravě chirálního sfingosinu Reist a Christie. K napojení uhlíkatého řetězce využili Wittigovu reakci mezi aldehydickou skupinou aminoderivátu allofuranosy (**9**) a ylidem vzniklým v prostředí fenyllithia z trifenyfosfoniové soli (**11**). Odbouráním acetonidu a deacylací aminoskupiny vzniká sfingosin (**1**).^{22, 25} Viz schéma 3.

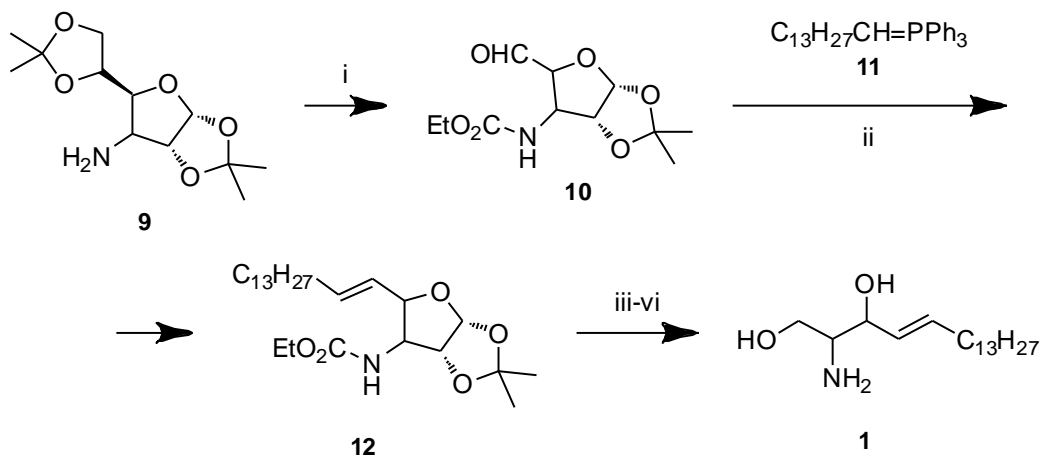


Schéma 3. (i) ethyl-chlorformiát/pyridin/75% AcOH/ NaOH/ $NaIO_4$; (ii) $PhLi/benzen$; (iii) AcOH; (iv) $NaIO_4$; (v) $NaBH_4$; (vi) $Ba(OH)_2$.

Stereoselektivní syntéza všech čtyř diastereoizomerů sfingosinu podle Leea²⁶ vychází z methylesteru L-serinu (**18**). Ochráněný methylester L-serinu (**19**) je převeden v přítomnosti nadbytku karbaniontu připraveného z dimethyl-methylfosfonátu na β -ketofosfonát (**20**). Horner-Wadsworth-Emmonsonovou reakcí s tetradecylaldehydem je připraven příslušný enon (**21**). Po odstranění chránících skupin a redukcí ketoskupiny vzniká D-erythro-sfingosin (**1**). Viz schéma 4.

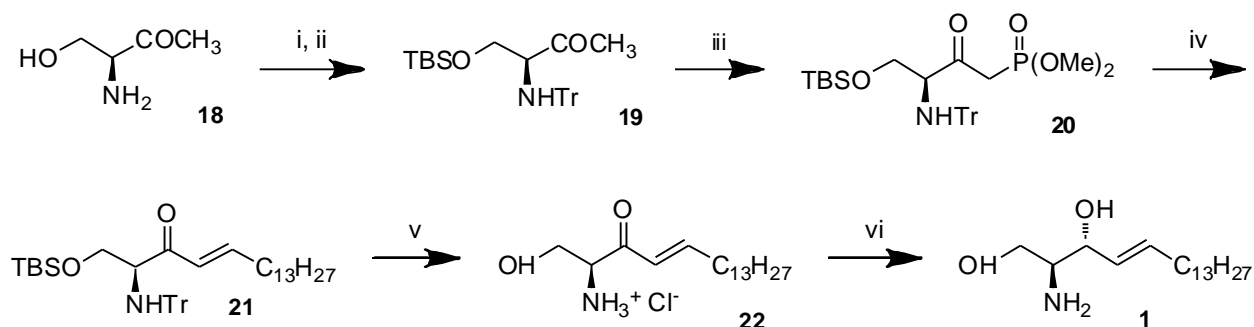


Schéma 4. (i) TBSCl/Et₃N; (ii) TrCl/ Et₃N; (iii) LiCH₂PO(OMe)₂; (iv) C₁₃H₂₇CHO/DBU/LiCl; (v) 2M HCl; (vi) Zn(BH₄)₂.

Příprava sfingosinu podle Yamamota²⁷ vychází z L-serinu (13), jehož primární aminoskupina i hydroxylová skupina je nejprve ochráněna a karboxyl je převeden na Weinrebův amid (14). Reakcí s vinylmagnesium-bromidem vzniká vinylketon (15), který je selektivně redukován tri-*t*-butoxyaluminohydridem lithným (16). Reakcí s pentadec-1-enem v prostředí Grubbsova katalyzátoru vzniká *D-erythro*-sfingosin (1). Viz schéma 5.

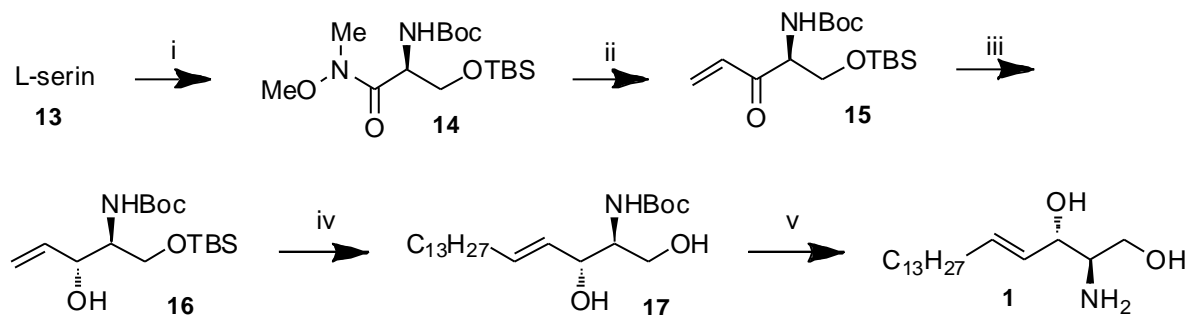


Schéma 5. (i) a) Boc₂O/Et₃N, b) Me(MeOH)NH.HCl/NMM, c) TBSCl/imidazol; (ii) vinylmagnesium-bromid; (iii) LiAl(O-*t*Bu)₃H; (iv) a) 2M HCl/MeOH, b) pentadec-1-en/Grubbsův katalyzátor B; (v) TFA.

Příprava ceramidů pro účel této diplomové práce byla převzata podle Garnera,^{28,29} vychází z chráněného methylesteru L-serinu a podrobněji je uvedena v experimentální části.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie a přístroje

Chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich. Tenkovrstevné chromatografie byly prováděny na TLC deskách Silica gel 60 F₂₅₄, výrobce Merck. Teploty tání produktů byly změřeny na Koflerově přístroji. Připravené látky byly charakterizovány IČ spektry (spektrofotometr Nicolet Impact 400) a spektry NMR (přístroj Varian Mercury-Vx BB), ¹H při 300 MHz a ¹³C při 75 MHz.

3.2. Syntéza

Pro přípravu cílových látek byl zvolen následující postup (Schéma 6 a 7). Z komerčně dostupného chráněného L-serinu **23** byl připraven nejprve cyklický acetal **24**. Esterová skupina této látky byla redukována pomocí diisobutylaluminium hydridu (DIBAL) na tzv. Garnerův aldehyd²⁸ **25**. Jeho alkynylací pomocí příslušného terminálního alkynu v prostředí butyllithia a hexamethylfosforamidu (HMPA) byl připraven alkynový analog chráněného sfingosinu **26a** nebo **26b**.

Pro přípravu analogů sfingosinu byly vyzkoušeny tři postupy: Postup A spočíval v redukci trojné vazby pomocí lithia v ethylaminu za vzniku chráněných analogů sfingosinu **27a,b** a následné hydrolyze chránících skupin pomocí 1M HCl v dioxanu na příslušné analogy sfingosinu **28a,b**.²⁹ Postup B byl obdobný, ale redukce byla provedena LiAlH₄ a odstranění chránících skupin kyselinou trifluoroctovou (TFA).³⁰ Postup C, který jsem vyzkoušela, spočíval v přehození těchto reakčních kroků z postupu A, tedy nejprve odstranění chránících skupin a pak redukce trojné vazby (Schéma 6).

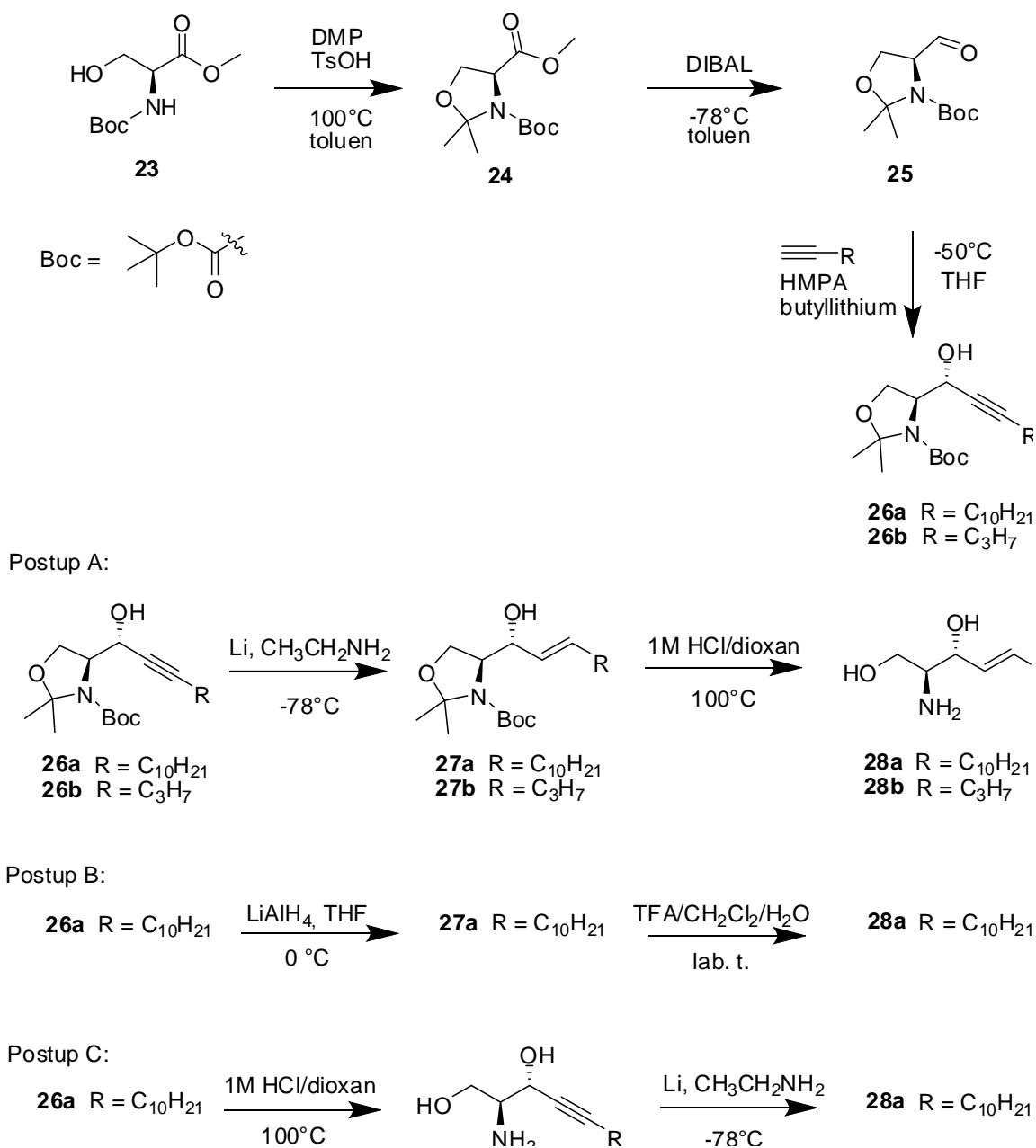


Schéma 6. Příprava analogů sfingosinu s kratším řetězcem

Z připravených analogů sfingosinu s délkou řetězce 15 uhlíků (**28a**) a 8 uhlíků (**28b**) byly acylací primární aminoskupiny pomocí chloridů příslušných kyselin připraveny ceramidy s délkou acylu 2 a 4 uhlíky (**Cer15/2**, **15/4**, **8/2** a **8/4**). Ceramidy s délkou acylu 6 (**Cer15/6** a **Cer 8/6**) uhlíků byly připraveny pomocí sukcinimidyl-hexanoátu.

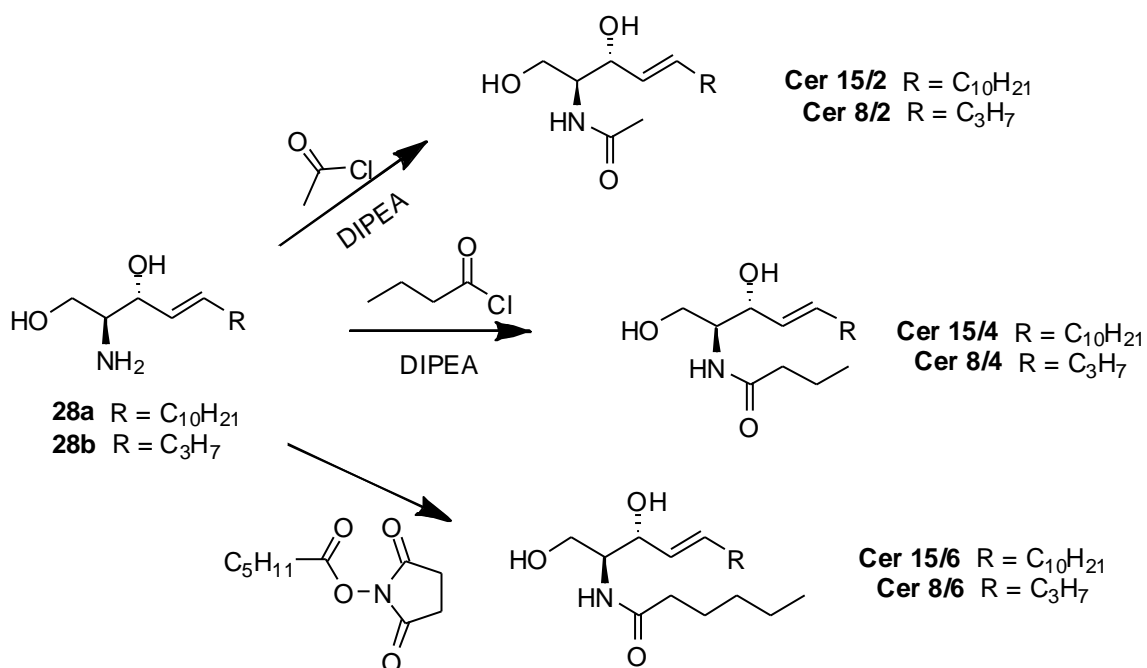
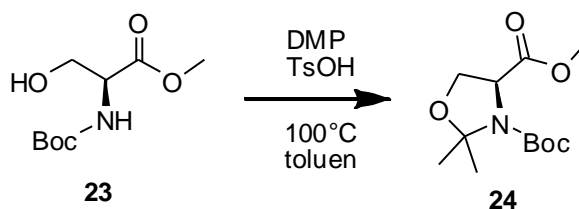


Schéma 7. Příprava konečných produktů – ceramidů se zkráceným acylem i sfingosinovým řetězcem

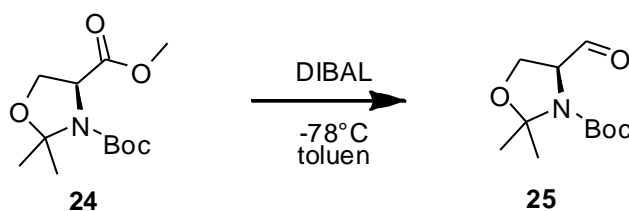
3.2.1. Příprava (S)-3-*tert*-butyl-4-methyl-2,2-dimethyloxazolidin-3,4-dikarboxylátu (24)



20,0 g (91,2 mmol) methylesteru *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-serinu (**23**), 21,4 g (205,0 mmol) dimethoxypropanu a katalytické množství kyseliny *p*-toluensulfonové (TsOH) bylo za stálého míchání zahříváno k varu v prostředí toluenu pod zpětným chladičem 60 min. Podle TLC (mobilní fáze hexan/ethanol 1:1, R_f 0,72) bylo v reakční směsi ještě velké množství nezreagované výchozí látky, proto bylo do směsi přidáno 6,8 g (65,3 mmol) dimethoxypropanu. Po ochlazení na laboratorní teplotu a odpaření části rozpouštědla za sníženého tlaku byla směs vytřepána mezi diethylether (3x200 ml) a nasycený roztok NaHCO₃ (100 ml). Organická fáze byla dále znovu vytřepána s nasyceným roztokem NaHCO₃ (200 ml), následně s nasyceným roztokem NaCl (120 ml), poté vysušena bezvodým MgSO₄ a po jeho odfiltrování zahuštěna na vakuové odparce. Produkt (**24**) byl přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 1:1). Produktem byla

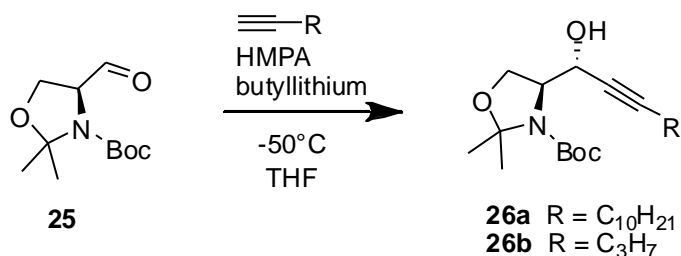
bezbarvá kapalná látka, výtěžek činil 60 %. IR a NMR spektra byla v souladu s literaturou.²⁸

3.2.2. Příprava Garnerova aldehydu ((*S*)-*tert*-butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát; **25**)



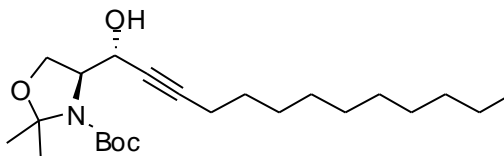
Ke 12,0 g (46,3 mmol) esteru (**24**), rozpuštěného v 90 ml suchého toluenu v dusíkové atmosféře při teplotě -78 °C bylo za stálého míchání pomalu přidáno 80,0 ml 1M roztoku diisobutylaluminiumhydridu (DIBAL) tak, aby teplota směsi nepřesáhla -65 °C (cca 1 h). Po 2 hodinách stálého míchání při -78 °C v atmosféře N₂ a průběžného monitorování TLC (mobilní fáze hexan/ethanol 4:1, *R_f* 0,4) byla reakce ukončena přikapáváním 20 ml methanolu v teplotním rozmezí do -65 °C. Po přidání 280 ml 1M HCl byla vzniklá emulze vytřepána 3x 250 ml ethyl-acetátu a následně organická fáze 1x 150 ml nasyceným roztokem NaCl. Po vysušení Na₂SO₄ byla směs zahuštěna na vakuové odparce a přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1). Produktem byla bezbarvá kapalná látka. Výtěžek reakce: 96 %. IR a NMR spektra byla v souladu s literaturou.²⁸

3.2.3. Alkynylace Garnerova aldehydu (příprava alkynů **26a,b**)

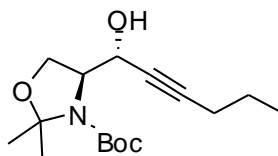


Ke směsi terminálního alkynu (dodec-1-ynu nebo pent-1-ynu) (18,3 mmol) a butyllithia (21,9 mmol) ve 25 ml suchého tetrahydrofuranu (THF) při chlazení na -50 °C a pod atmosférou N₂ bylo přidáno 5,5 g (30,7 mmol) hexamethylfosforamidu (HMPA) a posléze 3,5 g (15,3 mmol) Garnerova aldehydu (**25**) tak, aby nárůst teploty v reakční směsi byl co nejmenší. Po 2 h stálého míchání byla reakční směs ohřátá na laboratorní teplotu a do

baňky přidán roztok chloridu amonného. Soustava byla extrahována 3x150 ml ethyl-acetátu a po vysušení a odpaření rozpouštědla přečištěna gradientovou sloupcovou chromatografií s mobilní fází hexan/ethyl-acetát.



3.2.3.1. (*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R*)-1-hydroxytridec-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (**26a**). Produktem byla bezbarvá kapalná látka, mol. hm. 395,6 g/mol. Výtěžek reakce činil 61 %. TLC: mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1, R_f 0,68. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,25-3,75 (m, 5H); 2,10-1,95 (m, 2H); 1,55-1,45 (m, 15H); 1,35-1,20 (m, 16H); 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 154,4; 94,9; 83,9; 77,4; 65,1; 64,2; 31,9; 29,6; 29,5; 29,3; 29,1; 28,9; 28,5; 28,4; 25,7; 22,7; 18,7; 14,1. IR (samotná látka, ATR): ν_{max} 2924, 2854, 1692, 1365 cm^{-1} .

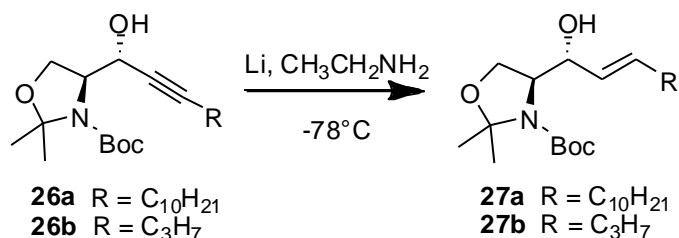


3.2.3.2. (*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R*)-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (**26b**). Produktem byla bezbarvá kapalná látka, mol. hm. 297,4 g/mol. Výtěžek reakce činil 43 %. TLC: mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1, R_f 0,51. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4,25-3,75 (m, 5H); 2,17 (dt, $J = 7,1$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 2H); 1,65-1,40 (m, 15H); 1,25 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 0,96 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153,0; 95,0; 86,6; 81,2; 77,4; 65,1; 64,2; 28,3; 28,2; 24,6; 20,7; 13,5. IR (samotná látka, ATR): ν_{max} 3462, 2934, 2874, 1690, 1365 cm^{-1} .

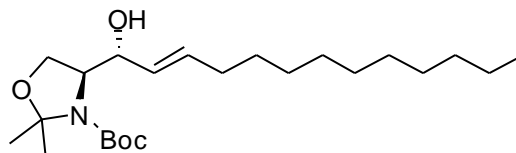
3.2.4. Příprava analogů sfingosinu

3.2.4.1. POSTUP A

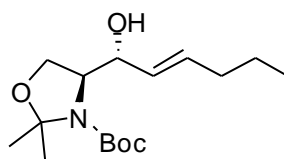
3.2.4.1.1. Redukce trojné vazby lithiem v ethylaminu (příprava chráněných analogů sfingosinu 27a,b)



K redukci trojné vazby bylo použito 1 g (144,1 mmol) lithia, rozpuštěného ve 20 ml ethylaminu při teplotě $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ v atmosféře dusíku, k němuž se přidalo 6,5 mmol **26a**, rozpuštěného v 17 ml suchého THF. Po třech hodinách byla reakce ukončena přidáním 30% roztoku chloridu amonného. Ethylamin byl odstraněn proudem dusíku a reakční směs byla extrahována 3x150 ml diethyletheru a organická fáze byla promyta 100 ml roztoku NaCl. Po vysušení síranem sodným a odstranění rozpouštědla na vakuové odparce byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií mobilní fází hexan/ethyl-acetát 9:1.

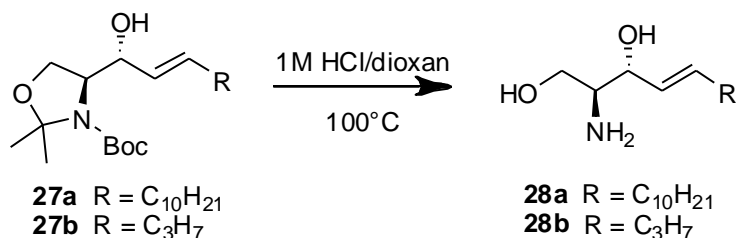


3.2.4.1.1.1. (*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R,E*)-1-hydroxytridec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyl-3-oxazolidin-3-karboxylát (**27a**). Produktem byla bezbarvá kapalná látka, mol. hm. 397,6 g/mol. Výtěžek reakce činil 70 %. TLC: mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1, R_f 0,39. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5,73 (dt, $J = 15,4, 6,7$ Hz, 1H); 5,43 (dd, $J = 15,4, 5,9$ Hz, 1H); 4,25-3,75 (m, 5H); 2,10-1,95 (m, 2H); 1,55-1,45 (m, 15H); 1,35-1,20 (m, 16H); 0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 154,8; 133,4; 128,1; 94,4; 81,0; 77,4; 74,0; 64,9; 32,4; 31,9; 30,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 29,1; 28,9; 28,5; 28,4; 25,7; 22,7; 18,7; 14,1. IR (samotná látka, ATR): ν_{max} 3454, 2924, 2854, 1698, 1365 cm^{-1} .

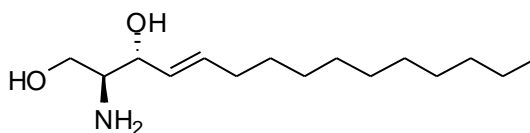


3.2.4.1.1.2. (*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R,E*)-1-hydroxyhex-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (**27b**). Produktem byla bezbarvá kapalná látka, mol. hm. 299,4 g/mol. Látka byla bez dalšího čištění použita do další reakce.

3.2.4.1.2. Odstranění chránících skupin 1M HCl v dioxanu (příprava analogů sfingosinu **28a,b**)

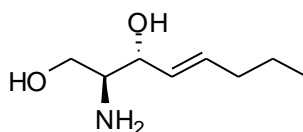


K produktu z předchozí reakce bylo přidáno 70 ml směsi dioxan/1M HCl (1:1) a v atmosféře N₂ mícháno 2 hodiny za varu. Po odpaření poloviny objemu rozpouštědla byla směs nejprve extrahována směsí diethylether/hexan 1:1 (4x100 ml), po alkalizaci vodné fáze 1M studeným roztokem NaOH na pH~10 následně vytřepána do 3x200 ml dichlormethanu. Organické fáze byly spojeny a vytřepány s roztokem KBr (100 ml), po vysušení bezvodým síranem sodným přečištěno aktivním uhlím, po filtraci odpařeno rozpouštědlo vakuově. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií, mobilní fáze dichlormethan/methanol/triethylamin 80:20:2.



3.2.4.1.1.1. (*2S,3R,E*)-2-Aminopentadec-4-en-1,3-diol (**28a**) Produktem byla bezbarvá kapalná látka, mol. hm. 257,4 g/mol. Výtěžek reakce činil 88 %. TLC: mobilní fáze mobilní fáze *n*-butanol/CH₃COOH/H₂O 4:1:1, *R_f* 0,74. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5,68 (dt, *J* = 15,4, 6,7 Hz, 1H); 5,39 (dd, *J* = 15,4, 6,8 Hz, 1H); 4,00 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H); 3,70-3,50 (m, 2H); 2,90-2,75 (m, 1H); 2,61 (br s, 4H); 2,05-2,00 (m, 2H), 1,40-1,15 (m, 16H); 0,81 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 134,6; 129,1; 75,0; 63,5; 56,1;

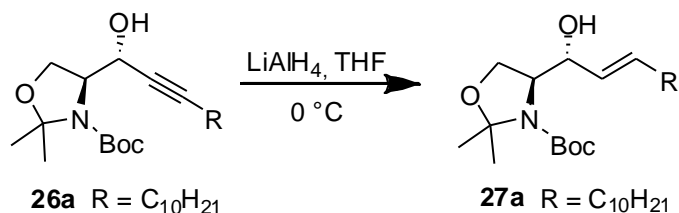
31,9; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 29,2; 22,7; 18,7; 14,1. IR (samotná látka, ATR): ν_{\max} 3363, 3259, 2917, 2849, 1582, 1467, 720 cm^{-1} .



3.2.4.1.1.2. (2*S*,3*R*,*E*)-2-Aminooct-4-en-1,3-diol (**28b**). Produktem byla bezbarvá kapalná látka, mol. hm. 159,2 g/mol. Výtěžek reakce činil 31 %. TLC: mobilní fáze dichlormethan/methanol/triethylamin 80:20:2, R_f 0,27. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5,73 (dt, $J = 15,4, 6,7$ Hz, 1H); 5,46 (dd, $J = 15,4, 7,0$ Hz, 1H); 4,08 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H); 3,70-3,60 (m, 2H); 2,90-2,80 (m, 1H); 2,78 (br s, 4H); 2,05-1,95 (m, 2H), 1,40-1,20 (m, 2H); 0,89 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 134,2; 129,6; 75,1; 63,7; 56,2; 31,9; 23,3; 14,1. IR (samotná látka, ATR): ν_{\max} 3347, 3282, 2927, 2871, 1456 cm^{-1} .

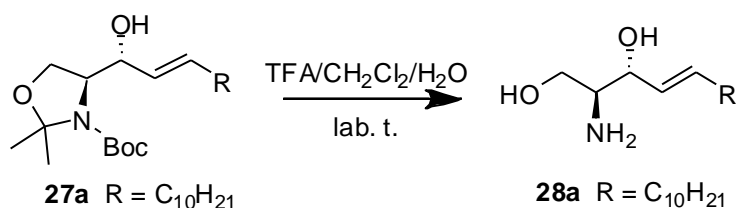
3.2.4.2. POSTUP B

3.2.4.2.1. Redukce trojné vazby LiAlH_4 - příprava *tert*-butyl 4-(1-hydroxyalk-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátů (**27a**)



K 2,1mmol alkyneu **26a** ve 25 ml suchého THF bylo v dusíkové atmosféře za stálého míchání při 0 °C přidáno 0,2 g (5,3 mmol) LiAlH_4 v 7 ml suchého THF. Po 15 min byla baňka vyjmuta z chladicí lázně a po 90 min při laboratorní teplotě byla reakce ukončena přidáním 30 ml 10% roztoku NaOH. Soustava byla 3x vytřepána 125 ml ethyl-acetátu a organická fáze následně 125 ml nasyceného roztoku NaCl. Po vysušení Na_2SO_4 , bylo rozpouštědlo odpařeno pod vakuem, produkt vysušen nad parafinem. Produktem byla bezbarvá kapalná látka. V této době nebylo možné změřit NMR spektra kvůli poruše přístroje, proto byla látka, dle TLC homogenní (mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, R_f 0,38), použita do další reakce. Výtěžek reakce: 45 %.

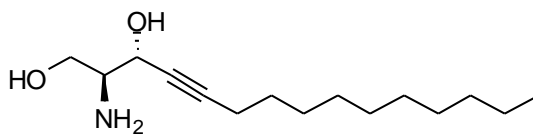
3.2.4.2.2. Odstranění chránících skupin pomocí TFA v CH₂Cl₂ (příprava analogu sfingosinu (28a))



Surový produkt z předchozí reakce (**27**) (0,93 mmol) byl vystaven desetihodinovému působení 10 ml kyseliny trifluoroctové (TFA) v prostředí 10 ml dichlormethanu (CH₂Cl₂) a vody (5ml) při stálém míchání a laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO₃ a poté byla směs extrahována 3x100 ml ethyl-acetátu, organická fáze byla dále vytřepána 1x100 ml nasyceného roztoku NaCl. Po vysušení MgSO₄, odpaření rozpouštědla a přečištění sloupcovou chromatografií (gradientově, mobilní fáze chloroform/methanol), bylo z NMR spekter shledáno, že předchozí redukce trojné vazby patrně neproběhla úplně a produktem je směs aminodiolů s dvojnou a trojnou vazbou. Vzhledem k tomuto faktu a nízkému výtěžku (22 %) jsme od postupu B upustili.

3.2.4.3. POSTUP C

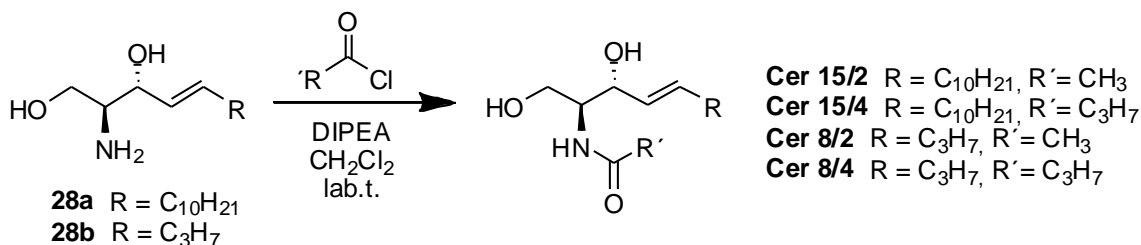
Nejprve byla provedena hydrolyza chránících skupin 1M HCl v dioxanu podle postupu 2.4.1.2. za vzniku analogu sfingosinu s trojnou vazbou **29a**. Výtěžek reakce byl však pouze 38%, proto jsme od tohoto postupu upustili.



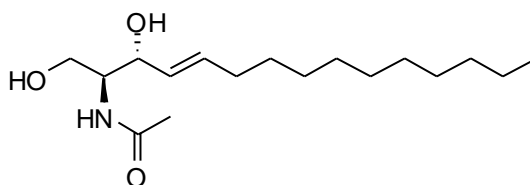
(2*S*,3*R*,*E*)-2-Aminopentadec-4-yn-1,3-diol (**29a**). Produktem byla bezbarvá kapalná látka, mol. hm. 255,4 g/mol. Výtěžek reakce činil 38 %. TLC: mobilní fáze mobilní fáze n-butanol/CH₃COOH/H₂O 4:1:1, *R_f* 0,5. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4,38 (br s, 1H); 3,70-3,50 (m, 2H); 3,00-2,85 (m, 1H); 2,65 (br s, 4H), 2,20 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 1,55-1,45 (m, 2H); 1,40-1,20 (m, 14H); 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 87,7; 67,0; 64,2; 58,1; 31,9; 29,6; 29,5; 29,3; 29,1; 28,9; 22,7; 18,7; 14,1. IR (samotná látka, ATR): *v*_{max} 3344, 3284, 2921, 2852, 1586, 1465, 721 cm⁻¹.

3.2.5. Příprava ceramidů

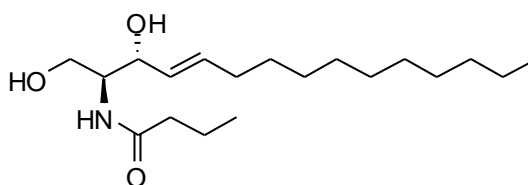
3.2.5.1. Acylace analogů sfingosinu pomocí chloridů kyselin (příprava Cer15/2, 15/4, 8/2 a 8/4)



Do baňky se 0,401 mmol analogu sfingosinu (**28a,b**) v 10ml suchého dichlormethanu pod atmosférou N₂ bylo přidáno 103,7 mg (0,802 mmol) ethyl(diisopropyl)aminu (DIPEA) a po ochlazení na 0 °C 0,401 mmol chloridu kyseliny octové nebo máselné. Po vyjmutí z ledové lázně byla reakce ukončena po 24h stálého míchání při laboratorní teplotě. Produkt byl rozdělen mezi vodu (30 ml) a dichlormethan (3x30 ml), vysušen a zahuštěn na vakuové odparce.



3.2.5.1.1. *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxypentadec-4-en-2-yl)acetamid (**Cer 15/2**). Látka byla přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze chloroform/methanol 50:1). Produktem byla bezbarvá krystalická látka, t.t. = 78-80 °C, mol. hm. 299,5 g/mol. Výtěžek reakce činil 51 %. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1, *R_f* 0,60. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5,90 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H); 5,75 (dt, *J* = 15,1, 7,0 Hz, 1H); 5,47 (dd, *J* = 15,5, 6,4 Hz, 1H); 4,40-4,10 (m, 6H); 2,05-2,00 (m, 2H), 2,00 (s, 3H); 1,40-1,15 (m, 16H); 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171,3; 134,7; 128,1; 73,2; 62,9; 53,2; 32,3; 31,9; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 29,1; 23,3; 22,7; 14,1. IR (samotná látka, ATR): ν_{\max} 3273, 2919, 2849, 1655, 1548, 1541, 1466, 722 cm⁻¹.

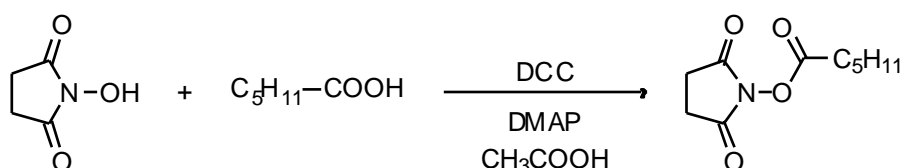


3.2.5.1.2. *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxypentadec-4-en-2-yl)butyramid (**Cer 15/4**). Látka byla přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze: chloroform/methanol 25:1). Produktem byla bezbarvá krystalická látka, t.t. = 45-47 °C, mol. hm. 327,5 g/mol. Výtěžek reakce činil 61 %. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1, R_f 0,37. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6,29 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H); 5,78 (dt, $J = 16,0, 7,0$ Hz, 1H); 5,52 (dd, $J = 15,4, 6,4$ Hz, 1H); 4,25-4,35 (m, 1H); 4,15-3,85 (m, 3H); 3,80-3,65 (m, 2H); 2,21 (t, $J = 7,3, 2\text{H}$); 2,04 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,75-1,60 (m, 2H); 1,40-1,15 (m, 16H); 0,96 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H); 0,88 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 173,8; 134,3; 128,7; 74,5; 62,4; 54,5; 38,7; 32,3; 31,9; 29,6; 29,6; 29,5; 29,5; 29,3; 29,2; 22,7; 19,1; 14,1; 13,7. IR (samotná látka, ATR): ν_{max} 3291, 2919, 2850, 1640, 1545, 1466, 721 cm^{-1} .

3.2.5.1.3. *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)acetamid (**Cer8/2**) a *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)butyramid (**Cer 8/4**). Produktem reakce byly směsi látek ve velmi malém celkovém množství, proto jsme od dalšího čištění upustili.

3.2.5.2. Acylace analogů sfingosinu pomocí sukcinimidyl-hexanoátu (příprava Cer15/6 a 8/6)

3.2.5.2.1. Příprava sukcinimidyl-hexanoátu

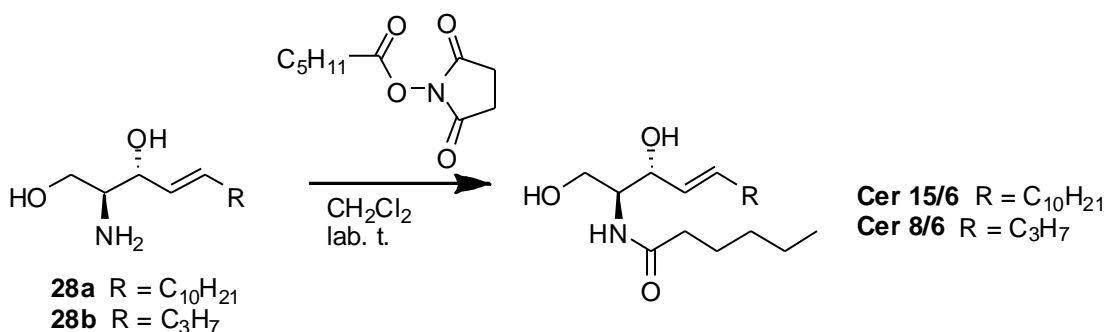


K suspenzi *N*-hydroxysukcinimidu (0,54 g; 4,7 mmol) v dimethylaminopyridinu (DMAP) (0,06 g; 0,5 mmol) v suchém ethyl-acetátu byla za stálého míchání přidána kyselina kapronová (0,54 g; 4,7 mmol). Soustava byla ochlazena na 0 °C a k ní přidáno 1,06 g (5,1 mmol) *N,N*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v suchém ethyl-acetátu. Po 24 h v atmosféře N_2 byla reakce ukončena přikápnutím ledové kyseliny octové. Po odfiltrování dicyklohexylmočoviny byl produkt extrahován vodou a nasyceným roztokem NaCl.

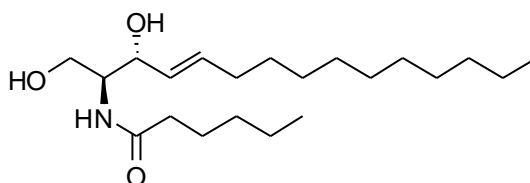
Rozpouštědlo bylo odstraněno na vakuové odparce. Po krystalizaci ze směsi ethanol/hexan byly krystaly produktu vysušeny v exsikátoru a poté přečištěny sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 7:3).

Produktem byla bezbarvá krystalická látka, t.t.: 53,7 °C (literatura uvádí 55-57 °C³¹), mol. hm. 213,2 g/mol. Výtěžek reakce činil 68 %. TLC: mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 7:3, R_f 0,33. Spektra byla v souladu s literaturou.³²

3.2.5.2.1. Acylace analogů sfinjosinu pomocí sukcinimidyl-hexanoátu



Analog sfinjosinu **28a** nebo **b** (0,338 mmol) a 71,9 mg (0,675 mmol) sukcinimidyl-hexanoátu ve 3 ml suchého dichlormethanu byly míchány za laboratorní teploty po dobu 24 h v atmosféře N₂. Po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze chloroform/methanol 25:1).



3.2.5.2.1.1. *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxypentadec-4-en-2-yl)hexanamid (**Cer 15/6**).

Produktem je bezbarvá krystalická látka, t.t.= 54-57 °C, mol. hm. 355,6 g/mol. Výtěžek reakce činil 46 %. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1, R_f 0,50. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6,40-6,25 (m, 1H); 5,78 (dt, $J = 15,5, 6,4$ Hz, 1H); 5,52 (dd, $J = 15,4, 6,4$ Hz, 1H); 4,35-4,25 (m, 1H); 4,15-3,65 (m, 5H); 2,21 (t, $J = 7,3$, 2H); 2,04 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 1,75-1,60 (m, 2H); 1,40-1,15 (m, 18H); 1,00-0,75 (m, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 174,2; 134,3; 128,8; 74,6; 62,6; 54,5; 36,9; 32,3; 31,9; 31,4; 29,5; 29,3; 29,1; 28,9; 28,5; 25,5; 22,7; 22,4; 18,7; 14,1; 13,9. IR (samotná látka, ATR): ν_{\max} 3294, 2920, 2851, 1646, 1619, 1551, 1466, 722 cm⁻¹.

3.2.5.2.1.2. *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)hexanamid (**Cer 8/6**)

Produktem reakce byla směs látek ve velmi malém množství, proto jsme od jejího čištění upustili.

3.3. Permeační pokusy

3.3.1. Modelová léčiva

Schopnost látek ovlivnit průnik léčiva kožní bariérou byla sledována u modelových látek použitých již v dřívějších pokusech,¹ jednalo se o:

Theofylin (TH), $M_r=180,17$ g/mol, $\log P=-0,1$, $pK_a=1,7$ a $8,8$, flux přes prasečí kůži $J=2,06$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Indometacin (IND), $M_r= 357,79$ g/mol, $\log P=3,7$, $pK_a=4,5$, flux přes prasečí kůži $J=0,32$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Jejich výběr je dán výhodnými vlastnostmi pro pokus: za normálních okolností nejsou dráždivé, neovlivňují kožní bariéru a samostatně jí ochotně nepronikají. Navíc jsou snadno stanovitelné běžnými analytickými metodami.

3.3.2. Kůže

Jako modelová membrána pro pokusy sloužila prasečí kůže, použita byla především z etických důvodů a vybrána byla pro svou podobnost s lidskou kůží.

Prasečí uši byly zakoupeny z firmy Skaličan a.s. Byly odděleny od těla ještě před čištěním horkou vodní párou k zajištění integrity kožní bariéry. Kůže plné tloušťky byla odpreparována z dorzální strany ucha mrtvého zvířete pomocí skalpelu a opatrně zbavena chlupů jejich zastřížením. Pomocí dermatomu (Acculan, Aesculap) byla tloušťka kůže následně upravena na 1000 μm . Z důvodu konzervace byly její fragmenty ponořeny do $0,05\%$ roztoku azidu sodného na dobu 5 minut a po osušení uloženy do polyethylenových sáčků a skladovány při teplotě -20 °C.

Po objektivnější hodnocení byla v každém pokusu použita kůže minimálně ze tří zvířat.

3.3.3. Donorové vzorky

Donorové vzorky byly připraveny jako suspenze TH (5,0%) nebo IND (2,5%) vždy s přídatkem ceramidu (1,0%) v 60% propylenglykolu. Jako kontrolní vzorky sloužily roztoky léčiv v 60% propylenglykolu. Roztoky byly nejprve homogenizovány po dobu 5 min a teplotě 50 °C ve vodní lázni na magnetické míchače a následně uloženy do termostatu (37 °C) na 24 h. Před pokusem byly homogenizovány na laboratorní třepače.

3.3.4. Akceptorová fáze

Jako akceptorová fáze pro stanovované léčivo byl použit izotonický fosfátový pufr pH 7,4 (PBS), který je s léčivem kompatibilní, zaručuje jejich vysokou rozpustnost a zároveň je vhodný při HPLC analýze. Byl připraven přidáním 19,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 400 ml vody pro HPLC k 2,1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml vody pro HPLC. Hodnota pH směsi rozpuštěných solí byla upravena přidáním koncentrovaného roztoku NaOH na 7,4. K izotonizaci pufru bylo použito 3,96 g NaCl a k jeho konzervaci 0,27 g NaN_3 .

3.3.5. Provedení permeačních pokusů

K pokusům sloužily skleněné Franzovy cely, složené ze dvou oddělených částí, donorové a akceptorové, stažených gumičkou. Mezi ně byla vložena 2 plexiskla s kruhovým otvorem uprostřed o velikosti 0,5 cm², který vymezoval permeační plochu. Kousky kůže, nařezány skalpelem na rozměr cca 1x1cm, byly zafixovány mezi destičky silikonovým olejem dermální stranou směrem dolů do akceptorové fáze.

Akceptorová fáze simulující krevní oběh byla zastoupena fosfátovým pufrem v objemu přibližně 6 ml, určeném velikostí cely. Jeho přesná hodnota byla zjišťována pro každou celu zvlášť a byla zahrnuta do výpočtů. Homogenitu fáze zajišťovalo na dně cely umístěné míchadlo.

Sestavené cely byly vloženy do vodní lázně vytemperované na 32 °C min 30 min před nanesením vzorků pro vyrovnání teplot a hydrataci kůže. Posléze bylo na každou kůži (její svrchní stranu) aplikováno 80 μl vzorku a otvor byl zakryt krycím sklíčkem, aby nedocházelo k vypaření rozpouštědla.

V časových intervalech po 16, 19, 22, 25 a 28 hodinách bylo z objemu akceptorové fáze odebráno vždy 300 μl a nahrazeno stejným množstvím na 32 °C vytemperovaného pufru. Vzorky byly přeneseny do insertů ve skleněných vialkách a uzavřeny víčky se septem k HPLC analýze.

Po posledním odběru akceptorové fáze nenásledovalo doplnění objemu, cely byly rozebrány a z permeační plochy čtverců kůže byly po opláchnutí 60% ethanolem a destilovanou vodou vyseknuty vzorky o průměru 5 mm. Po osušení a zvážení byly kůže 48 h extrahovány 2,5 ml mobilní fáze pro analýzu konkrétního léčiva při teplotě 32 °C a za stálého míchání na vodní lázni s magnetickou míchačkou.

Účinnost extrakce byla stanovena již dříve a je $98\pm 2\%$ pro TH a $101\pm 7\%$ pro IND,¹ což je v souladu s doporučením FDA Guidance for Industry for Bioanalytical Method Validation, 2001.

3.4. Stanovení vzorků HPLC

3.4.1 Analytická metodika

Pro vyhodnocení permeačních pokusů byla použita metoda HPLC, jejíž metodika byla vypracována již dříve, a pro potřebu této diplomové práce byla přejata.

System zahrnuje dvě vysokotlaká čerpadla LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampler SIL-20A HT, kolonový termostat CTO-20AC, diode-array detektor SPD-M20A a komunikační modul CBM-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a integrační software LCsolutions verze 1.22.

Separace TH bylo dosaženo za použití kolony LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 RP-18,5 μm (Merck, Darmstadt, SRN), při teplotě kolony 35°C. Mobilní fáze: 0,1M NaH_2PO_4 /methanol 6:4 (v/v), její průtok: 1,2ml/min (tlak okolo 20Mpa), nástřik: 10 μl . Detekce: UV, vlnová délka 272nm. Retenční čas se pohyboval okolo 3min (analýza trvala cca 3,6min).

Pro analýzu IND na výše uvedené koloně při teplotě 40°C byla připravena mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina octová 90:60:5 (v/v/v), průtok 1,5ml/min, nástřik: 50 μ l. Detekce: UV při vlnové délce 260nm. Retenční čas \pm 3,9min, délka analýzy cca 5min.

3.4.2 Kalibrační standardy

Kalibrační standardy pro stanovení TH a IND byly připraveny naředěním zásobního roztoku příslušného léčiva ve fosfátovém pufru s přidavkem azidu sodného o koncentraci 10mg/10ml. Použity byly vzorky o koncentraci 10; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,1; 0,05 mg/ml.

3.4.3 Parametry kalibračních křivek

Po nastříknutí kalibračních vzorků na kolonu byla odezva odečtena jako plocha pod píkem. Ze získaných dat byla sestrojena kalibrační křivka, jejíž parametry byly stanoveny metodou lineární regrese.

Kalibrace TH	$y = 282240 x$	$r = 0,99999$	$r^2 = 0,99998$
Kalibrace IND	$y = 787155,5 x$	$r = 0,99990$	$r^2 = 0,99980$

Hodnota y představuje plochu pod píkem, odpovídá odezvě detektoru. Koncentraci analyzované látky zastupuje parametr x , r je korelační koeficient, r^2 koeficient determinace.

3.4.4 Analýza dat

Kumulativní množství léčiva (permeantů), které prošlo kůží do akceptorové fáze, bylo přepočítáno vzhledem k odběrům a doplňování akceptorové fáze a přesnému objemu cel. Hodnoty byly vyneseny do grafů v závislosti na čase. Pro výpočet příslušných fluxů J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) byla použita oblast ustáleného toku permeantu (lineární oblast křivky) a flux

byl odečten jako hodnota směrnice této přímký. Koncentrace léčiv v kůži jsou přepočítány na přesnou hmotnost vzorku tkáně.

Ke statistickému zpracování byl použit test ANOVA s Dunnettovým post testem. Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm SEM (standardní chyba).

4. Výsledky a diskuze

Cílem této diplomové práce byla příprava analogů ceramidů se zkráceným řetězcem sfingosinu a krátkým acylem a hodnocení jejich vlivu na permeabilitu kůže.

Příprava cílových ceramidů vycházela z komerčně dostupného methylesteru L-serinu **23**, chráněného na dusíku Boc skupinou. Tuto látku jsem nejprve pomocí kysele katalyzované reakce s 2,2-dimethoxypropanem převedla na cyklický acetonid **24**, tedy derivát s ochráněným primárním hydroxylem i karbamátovým dusíkem. Výtěžek této reakce byl 60 %, což je nižší, než výtěžky uváděné v literatuře (Garner uvádí 70 %²⁸ a Novotný dokonce 89 %¹), pro další práci to však bylo dostačující. Následovala redukce methylesteru na aldehyd **25**, který je také známý jako Garnerův aldehyd,²⁸ pomocí DIBAL. U této reakce někteří autoři uvádí nízké výtěžky a doporučují spíše redukcí až na primární alkohol pomocí LiAlH₄ a následnou oxidaci pyridinium-chlorchromátem³³ nebo Swernovou oxidací³⁴ na aldehyd. V mém případě však reakce probíhala bez problému za vysokého výtěžku (96 %). V následujícím kroku byl Garnerův aldehyd **25** alkynylován za vzniku alkynů **26a,b**. K této reakci byly použity dodecyn nebo pentyn a příslušný alkynid byl připraven pomocí butyllithia. Reakce s aldehydem byla provedena v přítomnosti HMPA, který díky komplexaci kationtů zvyšuje *anti*-selektivitu adice alkynidu (tedy výtěžek analogu 2*S*,3*R*-sfingosinu).³⁵ Výtěžky reakcí byly 61 % pro analog 15-uhlíkatého sfingosinu **26a** a 43 % pro analog 8-uhlíkatého sfingosinu **26b**.

Pro přípravu analogů sfingosinu byly vyzkoušeny tři postupy, z nichž byl kvůli nejvyšším výtěžkům vybrán postup A. Postup A, podle Garnera,²⁹ spočíval nejprve v redukcí trojné vazby pomocí lithia v ethylaminu na *trans*-dvojnou. Principem této reakce je vznik „volných“ elektronů z kovového lithia (a solvatovaných kationtů lithných), což je pozorováno jako vznik tmavě modrého roztoku. Tyto elektrony se mohou adovat na trojnou vazbu, protože sp uhlík je poměrně elektrofilní a vytvořit radikál-anion. Anion pak reaguje s protonem z ethylaminu, vzniklý radikál reaguje s dalším elektronem a následně s druhým protonem za vzniku *trans*-dvojnou vazby. Analog s delším řetězcem **27a** byl takto získán v 70% výtěžku. Kratší analog **27b** obsahoval po reakci komplikovanější směs látek, zřejmě obsahující i konečný sfingosin **28b** což mohlo být způsobeno částečným odstraněním chránících skupin v tomto silně redukčním prostředí. Tato vedlejší reakce byla již dříve popsána.²⁹ Proto byla získaná reakční směs použita do další reakce. Ta spočívala v odstranění obou chránících skupin varem ve směsi 1M HCl a dioxanu. V této fázi se

s produktem velmi obtížně pracuje kvůli volné primární aminoskupině spolu s hydrofobním řetězcem, což mu propůjčuje vlastnosti tenzidu. Nicméně, obě látky se podařilo přečistit sloupcovou chromatografií, 15-uhlíkatý sfingosin **28a** v 88% výtěžku a jeho kratší analog **28b** v 31% výtěžku (výtěžek po dvou reakcích).

Postup B zahrnoval stejné typy reakcí, ale za jiných podmínek. Trojná vazba byla redukována LiAlH_4 podle Kima.³⁰ Při této redukci propargylalkoholů nejprve dojde ke vzniku vazby mezi kyslíkem a hliníkem z LiAlH_4 . Pak proběhne intramolekulární přenos hydridového aniontu na sousední uhlík trojné vazby za vzniku karbaniontu na druhém uhlíku, pro který je v prostředí tetrahydrofuranu nebo dioxanu, které solvují kationty lithné, energeticky výhodnější *trans*-konfigurace.³⁶ Reakce je pak dokončena reakcí s protonem za vzniku *trans*-alkenu. Po redukci následovalo odstranění chránících skupin pomocí TFA.³⁰ Výtěžek byl však nižší než u postupu A.

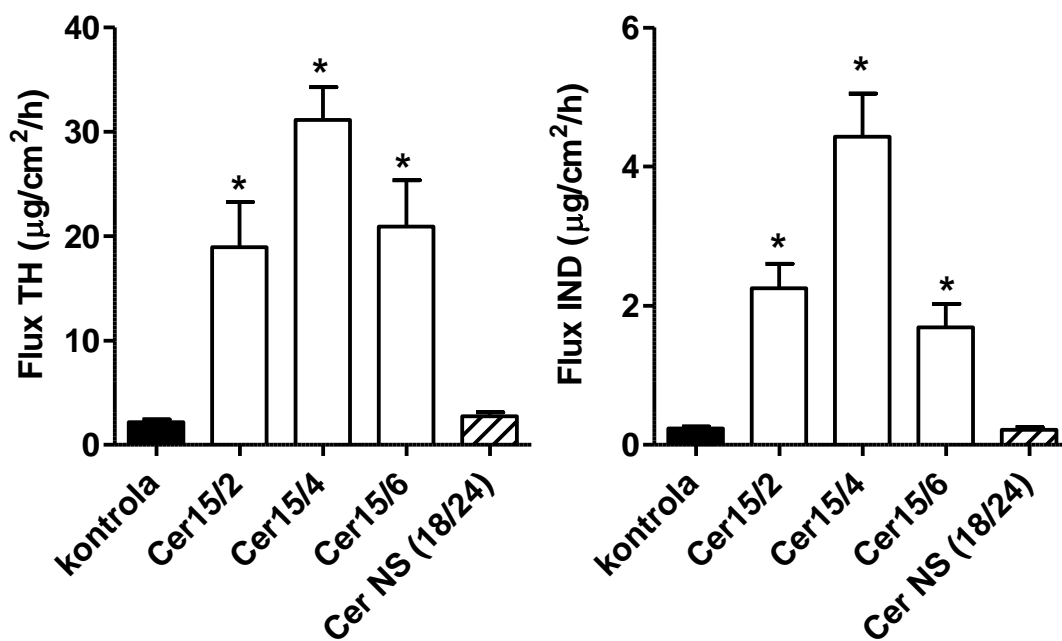
Postup C byl analogický postupu A, jen jsme plánovali přehodit pořadí reakcí. Už v prvním reakčním kroku však byl výtěžek nízký a vznikala špatně dělitelná směs, proto jsem tento postup dále nepoužila.

Z připravených analogů sfingosinu **28a,b** byly acylací aminoskupiny připraveny požadované ceramidy. Pro přípravu acetyl a butyryl derivátů byly použity příslušné chloridy kyselin, hexanoyl deriváty byly připraveny reakcí s sukcinimidylesterem kyseliny hexanové. Ceramidy s délkou sfingosinu 15 uhlíků (**Cer15/2**, **Cer15/4** a **Cer15/6** – čísla před lomítkem představují počet uhlíků sfingosinu a čísla za lomítkem počet uhlíků v acylu) se podařily připravit a vyčistit v dostatečném množství pro permeační pokusy, ceramidy odvozené od 8-uhlíkatého sfingosinu (**Cer8/2**, **Cer8/4** a **Cer8/6**) však byly získány jako komplikovanější směsi (zřejmě docházelo ve větší míře i k acylaci hydroxylů) a nepodařilo se je přečistit v dostatečném množství pro další práci. Tento problém by se dal v budoucnu odstranit chráněním hydroxylů silylovými chránícími skupinami, což jsou však dva reakční kroky navíc nebo provedením reakce za jiných podmínek například pomocí kyseliny a karbodiimidu.

Vliv analogů s krátkým acylem na permeabilitu kůže byl sledován na prasečích kůžích ve Franzových difúzních celách. Jako ukazatele propustnosti kůže sloužila modelová léčiva s rozdílnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, theofylin a indometacin. Výsledky permeací byly porovnány s dříve připravenými vzorky analogů ceramidů 12/4 a 18/4 (12C a 18C sfingosin se čtyřuhlíkatým acylem)¹ a fyziologickým ceramidem s 24-uhlíkatým acylem. Negativní kontrolní vzorky obsahovaly pouze léčivo v 60% propylenglykolu.

Jako akceptorová fáze byl použit izotonický fosfátový pufr o pH 7,4, který svými vlastnostmi napodobuje plazmu, a jsou v něm dobře rozpustná modelová léčiva, což zaručuje správné podmínky pro permeační pokus. Analytické hodnocení množství léčiva, které prošlo kůží, bylo provedeno metodou HPLC.

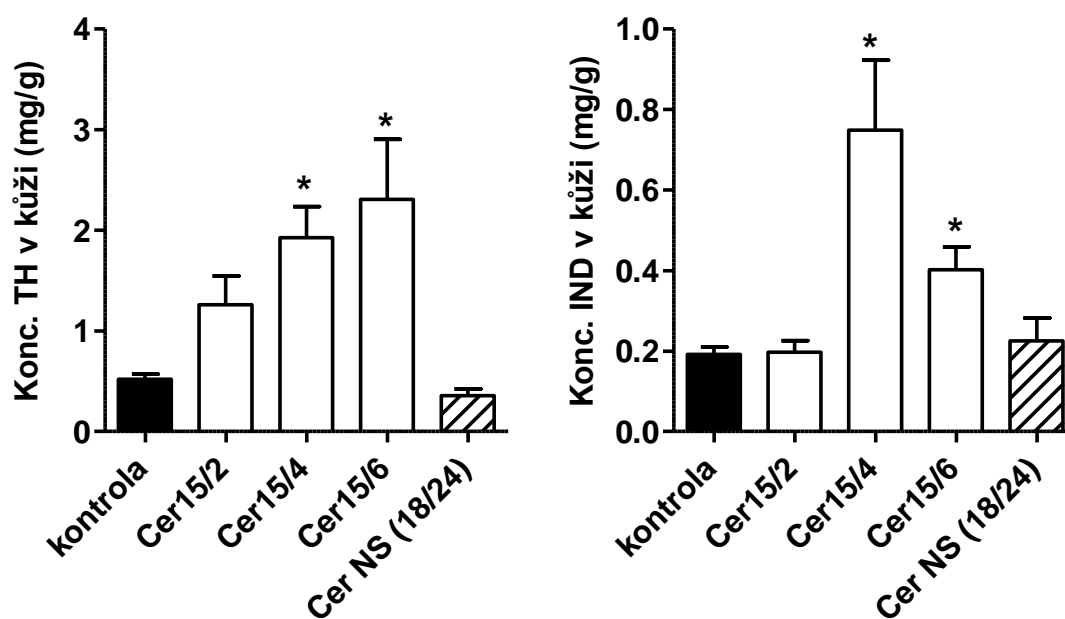
Vliv připravených analogů ceramidů na flux modelových léčiv přes kůži je uveden v Grafu 1. Výsledky potvrdily, že ceramidy s krátkým acylem ztrácejí své bariérové funkce a zvyšují propustnost kůže pro TH i pro IND. Pro kontrolní vzorky byly stanoveny tyto hodnoty fluxů: TH = $2,1 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, IND = $0,24 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Nejvýraznější vliv na permeabilitu kůže je patrný u analogu se čtyřuhlíkatým acylem (flux TH = $31,2 \pm 3,1$ a flux IND = $4,43 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Ve srovnání s negativní kontrolou ceramid 15/4 zvýšil flux TH 15,0krát a flux IND dokonce 18,7krát (viz graf 1.). Ceramid 15/2 dosáhl přibližně devítinásobného zvýšení propustnosti pro TH i IND (flux TH = $19,0 \pm 4,3$ a flux IND = $2,25 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), ceramid 15/6 desetinásobné zvýšení propustnosti pro TH (flux TH = $20,9 \pm 4,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a sedminásobné zvýšení propustnosti pro IND (flux IND = $1,69 \pm 0,34 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$).



Graf 1. Flux TH (vlevo) a flux IND (vpravo) z 60% propylengykolů (kontrola) a po přidání 1 % ceramidu 15/2, ceramidu 15/4, ceramidu 15/6 a fyziologického ceramidu NS (18/24). Data jsou prezentována jako průměry a SEM (standardní chyba), * udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

Po ukončení permeačních pokusů byla léčiva extrahována ze vzorků kůže (viz Graf 2). Zjištěná koncentrace u kontrolních vzorků: TH = $0,48 \pm 0,06$ mg/g; IND = $0,19 \pm 0,02$ mg/g. Vyšších koncentrací TH bylo dosaženo se současným podáním ceramidu 15/6 (koncentrace TH = $2,31 \pm 0,6$ mg/g). Vyšší množství IND v kůži bylo dosaženo s přidavkem ceramidu 15/4 (koncentrace IND = $0,75 \pm 0,17$ mg/g).

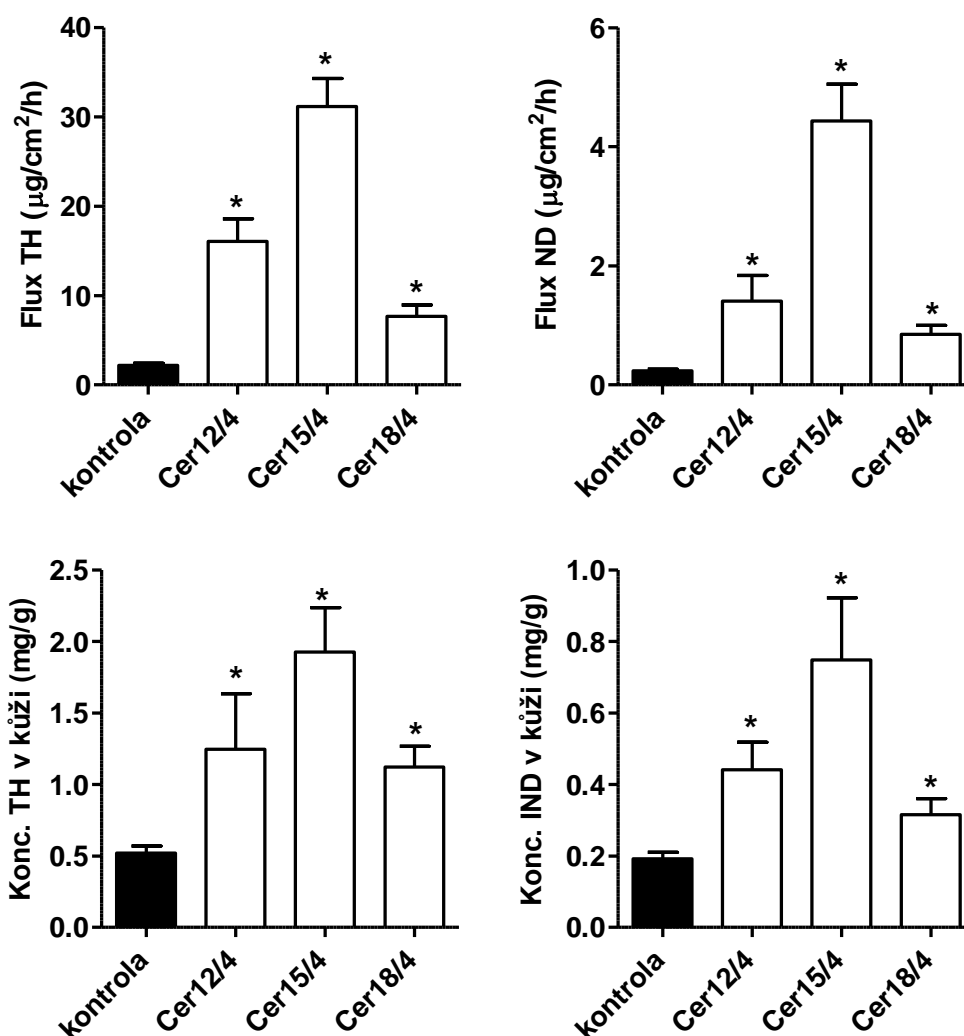
Ve srovnání s negativními vzorky, které obsahovaly pouze léčivo, zvýšil ceramid 15/4 koncentraci TH v kůži 4,0krát a koncentraci IND 3,9krát (koncentrace TH = $1,93 \pm 0,31$ mg/g a koncentrace IND = $0,75 \pm 0,17$ mg/g). Ceramid 15/6 zvýšil množství TH v kůži 4,8krát a množství IND 2,1krát (koncentrace TH = $2,31 \pm 0,60$ a koncentrace IND = $0,40 \pm 0,06$ mg/g). Ceramid 15/2 zvýšil koncentraci TH v kůži 2,6krát a koncentraci IND 1,0krát (koncentrace TH = $1,26 \pm 0,29$ mg/g a IND = $0,20 \pm 0,03$ mg/g).



Graf 2. Koncentrace TH (vlevo) a IND (vpravo) v kůži z 60% propylenglykolu (kontrola) a s přidavkem 1 % ceramidu 15/2, ceramidu 15/4, ceramidu 15/6 a fyziologického ceramidu NS (18/24). Data jsou prezentována jako průměry a SEM (standardní chyba), * udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

Srovnáme-li analogy ceramidů se stejnou délkou acylu a různou délkou sfingosinového řetězce (Graf 3), ceramidy s 15C sfingosinovým řetězcem ve srovnání s 12 a 18C deriváty vykazují překvapivě zvýšení permeability kůže pro obě léčiva. Zároveň množství léčiva v kůži po ukončení permeačních pokusů zůstává vyšší při podání

s ceramidy s délkou řetězce sfingosinu 15C ve srovnání s analogy 12 a 18C. Výjimku najdeme při sledování fluxu i koncentrace IND v kůži ve vzorku s ceramidem 15/6, kdy dvanáctiuhlíkatý analog zaznamenává vyšší hodnoty.



Graf 3. Flux TH (vlevo nahoře) a IND (vpravo nahoře) a koncentrace TH (vlevo dole) a IND (vpravo dole) v kůži z 60% propylenglykolu (kontrola) a s přidavkem 1 % ceramidu 12/4 ceramidu 15/4 a ceramidu 18/4. Data jsou prezentována jako průměry a SEM (standardní chyba), * udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

Možná vysvětlení, proč jsou krátké ceramidy schopny zvýšit permeabilitu kůže, jsou následující. Podle mnoha studií se na soudružnosti lipidových membrán podílí vodíkové můstky.^{37,38} Připravené ceramidy, studované v této práci, mají stejné schopnosti vytvářet vodíkové můstky jako přirozený ceramid NS a přesto narušily kožní bariéru.

Tento poznatek se shoduje s novějšími studiemi, které ukazují, že ceramidy odvozené od sfingosinu vytvářejí síť vodíkových vazeb se dvěma molekulami vody, nikoli se sousedními ceramidy, a to bez ohledu na délku řetězce.³⁹ Soudružnost sfingosinových ceramidů zajišťují hydrofobní interakce jejich řetězců, které jsou způsobeny přitažlivostí indukovaných dipólů v tomto řetězci a jsou silně závislé na jeho délce. Předpokládá se, že čím je řetězec kratší, tím slabší bude interakce, což vede ke zvýšení permeability lipidové membrány. Délka řetězce v molekule ceramidu je tedy pro bariérové vlastnosti kůže nejspíš důležitější než tvorba vodíkových vazeb.¹

Jako další vysvětlení zvýšení propustnosti kůže připadá v úvahu vzrůst fluidity lamel v důsledku náhrady dlouhého řetězce acylu v molekule ceramidu podstatně kratším zbytkem kyseliny. Tento rozdíl v délce řetězců může vést ke vzniku volného prostoru uvnitř membrány, který by pravděpodobně byl kompenzován zvýšenou pohyblivostí okolních řetězců, což by celkově zvýšilo propustnost kůže.

Třetí možností, jak vysvětlit pozorovaný vliv zkrácení acylového řetězce ceramidů, je vytvoření oddělených fází krátkými ceramidy, které by v rámci lipidových lamel s dlouhými řetězci mohly nabídnout léčivu permeabilnější „zkratku“ skrz membránu.⁴⁰

Co se týče vztahů mezi délkou sfingosinového řetězce ceramidů a jejich bariérové funkce, výsledky byly poměrně překvapivé. Schopnost mnou připravených ceramidů odvozených od 15-uhlíkatých ceramidů by mohla souviset s lichým počtem uhlíků. To je však nutné potvrdit dalšími pokusy, zejména studiem ceramidů s různými dalšími délkami sfingosinové části.

5. Závěr

Cílem práce byla syntéza analogů ceramidů se zkráceným řetězcem sfingosinu a krátkými acyly a hodnocení jejich vlivu na bariérové vlastnosti kůže. Šestikrokovou syntézou byly připraveny 3 analogy ceramidů, které byly použity k permeačním pokusům na prasečí kůži s využitím dvou modelových léčiv.

Výsledky práce potvrdily, že délka řetězců ceramidů je velice důležitá pro permeabilitu kůže. Analogy, v nichž byl řetězec dlouhé mastné kyseliny nahrazen krátkými acyly, vykazovaly zvýšení propustnosti kůže a zároveň zvýšení koncentrace léčiva v kůži po ukončení permeačních pokusů. Překvapivé bylo zjištění, že analog s 15-uhlíkatým sfingosinem vykazuje ve srovnání s 12 a 18C deriváty zvýšení propustnosti kůže a zároveň zvýšení koncentrace léčiva v kůži po ukončení permeačních pokusů.

Závěrem můžeme říci, že ceramidy s krátkým řetězcem acylu se nechovají jako fyziologické ceramidy, naopak bariérové vlastnosti kůže narušují.

6. Seznam zkratk

Ac acetyl
AD atopická dermatitida
Boc *tert*-butyloxykarbonyl
DBU 1,8-diazabicykloundec-7-en
DCC *N,N*-dicyklohexylkarbodiimid
DIBAL diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA *N*-ethyl-*N*-diisopropylamin
DMAP dimethylaminopyridin
DMP dimethoxypropan
Et ethyl
HMPA hexamethylfosforamid
HPLC vysoce účinná kapalinová chromatografie
IND indometacin
IR infračervené spektrum
Me methyl
NMR nukleární magnetická rezonance
PBS izotonický fosfátový pufr (pH 7,4)
Ph fenyl
SC stratum corneum
SEM standardní chyba
TBSCl *t*-butyldimethylsilyl-chlorid
TFA kyselina trifluoroctová
TH theofylin
THF tetrahydrofuran
TLC tenkovrstevná chromatografie
TsOH kyselina *p*-toluensulfonová

7. Literatura

- ¹ Novotný, J.; Janušová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2009, 22, 22-30.
- ² Novotný, J.; Pospěchová, K.; Hrabálek, A.; Čáp, R.; Vávrová, K. Synthesis of Fluorescent C24-Ceramide: Evidence for Acyl Chain Length Dependent Differences in Penetration of Exogenous NBD-Ceramides into Human Skin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 6975-6977.
- ³ Hrabálek, A., Vávrová, K. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. Lékařen.*, 2005, 1, 8-11.
- ⁴ Vávrová, K., Hrabálek, A. Role ceramidů v kůži. *Prakt. Lékařen.*, 2006, 2, 55-58.
- ⁵ Menon, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 54, 1, S3-S17.
- ⁶ Wertz, P. W., van den Bergh, B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 91, 85-96.
- ⁷ Squier, C. A., Cox, P., Wertz, P. W. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. *J. Invest. Dermatol.*, 1991, 96, 123-126.
- ⁸ Wertz, P. W., Downing, D. T. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.*, 1983, 24, 759-765.
- ⁹ Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Cerelli, S., Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1182, 147-151.
- ¹⁰ Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J. Biochemie pro studující medicíny. Karolinum, 2006, 1. vydání, 180.
- ¹¹ Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O. Základy histologie. H&H, 1999, 2. vydání, 340.
- ¹² Wertz, P. W. Lipids and barrier function of the skin. *Acta dermato-venerologica Suppl.*, 2000, 208, 7-11.
- ¹³ Suhonen, T. M., Bouwstra, J. A., Urtti, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Control. Release*, 1999, 59, 149-161.
- ¹⁴ Coderch, L., López, O., de la Maza, A. Parra, J. L. Ceramides and Skin Function. *American J. Clin. Dermatol.*, 2003, 4, 107-129.
- ¹⁵ Rogers, J., Harding, C., Mayo, A., Banks, J., Rawlings, A. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch. Dermatol. Res.*, 1996, 288, 765-770.
- ¹⁶ Denda, M., Koyama, J., Hori, J., Horii, I., Takahashi, M., Hara, M., Tagami, H. Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids, *Arch. Dermatol. Res.*, 1993, 285, 415-417.
- ¹⁷ Wefers, H., Melnik, B. C., Flühr, M., Bluhm, C., Lehmann, P., Plewig, G. Influence of UV irradiation on the composition of human SC lipids. *J. Invest. Dermatol.*, 1991, 96, 959-962.
- ¹⁸ Choi, M. J., Maibach, H. I. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2005, 6, 215-223.
- ¹⁹ Guy, R. H., Hadgraft, J. Physicochemical Aspects of Percutaneous Penetration and Its Enhancement. *Pharm. Res.*, 1998, 5, 753-758.
- ²⁰ Potts, R. O., Guy, R. H. Predicting Skin Permeability. *Pharm. Res.*, 1992, 9, 663-669.
- ²¹ Barry, B. W. Reflections on transdermal drug delivery. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1999, 2, 41-43.
- ²² Koskinen, P. M., Koskinen, A. M. P. Sphingosine, an Enigmatic Lipid: A Review of Recent Literature Syntheses. *Synthesis*, 1998, 1075-1091.
- ²³ Shapiro, D., Segal, H., Flowers, H. M. The Total Synthesis of Sphingosine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 1194-1197.

-
- ²⁴ Grob, C. A., Gadiant F. Die Synthese des Sphingosins und seiner Stereoisomeren. *Helv. Chim. Acta*, 1957, 40, 1145-1157.
- ²⁵ Reist, E. J., Christie, P. H. Synthesis of *trans*- and *cis*-Sphingosine. *J. Org. Chem.*, 1970, 35, 4127-4130.
- ²⁶ Lee, J.-M., Lim, H.-S., Chung, S.-K. A short and efficient stereoselective synthesis of all four diastereomers of sphingosine. *Tetrahedron Asymmetry*, 2002, 13, 343-347.
- ²⁷ Yamamoto, T., Hasegawa, H., Hakogi, T., Katsumura, S. Versatile synthetic method for sphingolipids and functionalized sphingosine derivatives via olefin cross metathesis. *Org. Lett.*, 2006, 8, 5569-5572.
- ²⁸ Garner, P., Park, J. M. The synthesis and configurational stability of differentially protected β -hydroxy- α -amino aldehydes. *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 2361-2364.
- ²⁹ Garner, P.; Park, J. M.; Malecki, E. A stereodivergent synthesis of D-erythro-sphingosine and D-threo-sphingosine from L-serine. *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 4395-4398.
- ³⁰ Kim, S.; Lee, Y. M.; Kang, H. R.; Cho, J.; Lee, T.; Kim, D. Synthesis of Novel Polyynic Analogues of Sphingoid Base via an Iterative Acetylene Homologation Sequence. *Org. Lett.* 2007, 9, 2127-2130.
- ³¹ Paquet, A. Further studies on the use of the thallium salt of N-hydroxysuccinimide for the preparation of succinimidyl esters. *Can. J. Chem.* 1979, 57, 2775-2778.
- ³² Danklmaier, J.; Hünig H. Synthesis of acyclic analogs of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). *Liebigs Ann. Chem.* 1990, 2, 145-150.
- ³³ Corey, E.J.; Suggs, W. Pyridinium Chlorochromate. An Efficient Reagent for Oxidation of Primary and Secondary Alcohols to Carbonyl Compounds. *Tetrahedron Lett.* 1975, 16, 2647-2650.
- ³⁴ Omura, K.; Swern, D. Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study. *Tetrahedron* 1978, 34, 1651-1660.
- ³⁵ Herold, P. Synthesis of D-Erythro- and D-Threo-Sphingosine Derivatives From L-Serine. *Helv. Chim. Acta* 1988, 71, 354-362
- ³⁶ Grant, B.; Djerassi, C. The mechanism of hydride reduction of 1-alkyn-3-ols. *J. Org. Chem.* 1974, 39, 968-970.
- ³⁷ Pascher, I. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 455, 433-451.
- ³⁸ Karlsson, K.-A. On the character and functions of sphingolipids. *Acta Biochim. Polonica*, 1998, 45, 429-438.
- ³⁹ Li, L., Tang, X., Taylor, K. G., DuPré, D. B., Yappert, M. C. Conformational characterization of ceramides by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.*, 2002, 82, 2067-2080.
- ⁴⁰ Vávrová, K., Zbytovská J., Hrabálek, A. Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 2273-2291.