

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



Syntéza a hodnotenie ľudských 6-hydroxyceramidov

Diplomová práca

Adam Majcher

Hradec Králové 2020

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

Konzultant: *PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.*

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som rád poďakoval svojmu školiteľovi *PharmDr.* Lukášovi Opálkovi, *Ph.D.* za odbornú pomoc, vedenie odborného rastu, trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval. Ďalej by som chcel poďakovať *PharmDr.* Andrejovi Kováčikovi, *Ph.D.* za jeho odborné rady a ústretovosť a Mgr. Pavlovi Jakubcovi za pomoc pri vypracovaní analytickej časti tejto práce. Veľké poďakovanie taktiež patrí *prof. PharmDr.* Kateřine Vávrovej, *Ph.D.* za to, že mi umožnila pracovať v jej laboratóriách a celej skupine *Skin Barrier Research Group*. V neposlednom rade by som chcel poďakovať mojej rodine a priateľom, ktorí pri mne stáli a vždy ma podporovali.

Prehlásenie

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

V Hradci Králové 2020

Adam Majcher

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Abstrakt	6
1.2 Abstract	8
1.3 Úvod a cieľ práce	10
2. Teoretická časť	11
2.1 Koža	11
2.2 Stavba ľudskej kože	12
2.3 Stratum corneum	15
2.3.1 Stavba SC	15
2.3.2 Lipidy v SC	16
2.3.3 Organizácia lipidov v SC	17
2.4 Ceramidy	20
2.4.1 Nomenklatúra a chemická štruktúra	20
2.4.2 De novo Biosyntéza Ceramidov	23
2.4.3 „Salvage pathway“ biosyntézy Ceramidov	25
2.4.4 Sfingomyelinázová dráha biosyntézy Ceramidov	25
2.4.5 Ceramidy a vznik kožnej bariéry	26
2.5 H-Ceramidy	27
2.5.1 Objav (H) a H-Cer	27
2.5.2 Bioorganický pohľad na H-Ceramidy	28
2.5.3 H-Cer a kožné ochorenia	28
3.1 Výsledky a diskusia - Syntéza	30
3.1.1 Schéma syntézy	32
3.1.2 Syntéza 6-hydroxysfingozínu	33
3.1.3 Syntéza 6-hydroxyceramidov	39
3.1.4 Syntéza (<i>R</i>)-Cerebrónovej kyseliny	40
3.2 Výsledky a diskusia - Hodnotenie lipidových membrán s CerNH	41
3.2.1 Izotopová substitúcia	42
3.2.2 Valenčná symetrická vibrácia	42
3.2.3 Deformačná nožnicová vibrácia	45
3.2.4 Zhrnutie	46
4.1 Experimentálna časť - syntéza	47
4.1.1 Technické parametre a chemikálie	47
4.1.2 Príprava 6-hydroxysfingozínu	48
4.1.3 LC/MS hodnotenie vplyvu prídavku HMPA na alkynyláciu (<i>S</i>)-GA	61
4.1.4 Príprava H-Ceramidov	63

4.2 Experimentálna časť - Hodnotenie lipidových membrán s CerNH	68
4.2.1 Technické parametre a chemikálie.....	68
4.2.2 Príprava modelových lipidových membrán.....	68
4.2.3 Spracovanie dát.....	68
5. Záver	69
6. Zoznam skratiek	71
7. Použitá literatúra	73

1. Úvod

1.1 Abstrakt

Názov Diplomovej práce: *Syntéza a hodnotenie ľudských 6-hydroxyceramidov*

Kandidát: *Adam Majcher*

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

Konzultant: *PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D*

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Skin Barrier Research Group, Katedra organické a bioorganické chemie

Ceramidy (Cer) sú súčasťou veľkej rodiny sfingolipidov, ktoré sa nachádzajú vo všetkých ľudských bunkách a hrajú významnú rolu v bunkovej signalizácii. Vo vysokých koncentráciách môžeme Cer nájsť v najvrchnejšej vrstve epidermis, ktorá sa nazýva *stratum corneum*. Cer spolu s voľnými mastnými kyselinami a cholesterolom (v približne ekvimolárnom pomere), vytvárajú intercelulárnu lipidovú matrix. Hlavnou funkciou *stratum corneum* je bariérová ochrana organizmu, teda udržanie vodnej a elektrolytovej homeostázy a zábrana vstupu škodlivín do tela.

Cer sa skladajú zo sfingoídnej báze a acylovej časti odvodenej od vyššej mastnej kyseliny. Cer odvodené od 6-hydroxysfingozínu (**H**) patria medzi obzvlášť nezvyčajné sfingolipidy. V porovnaní s Cer odvodenými od sfingozínu, Cer odvodené od 6-hydroxysfingozínu (**H-Cer**) boli nájdené len v epidermis a taktiež nie sú typické pre všetky cicavce. Funkcia a biosyntéza týchto látok doteraz nie je úplne pochopená. Niekoľko dermatologických štúdií poukázalo na znížené koncentrácie H-Cer v koži pacientov s atopickou dermatitídou. Najväčším problémom pri štúdiu týchto látok je, že sú komerčne nedostupné a ich syntéza je zložitá. Cieľom tejto práce teda bolo popísať novú syntetickú cestu k H ako známemu prekursoru pre všetky podskupiny H-Cer.

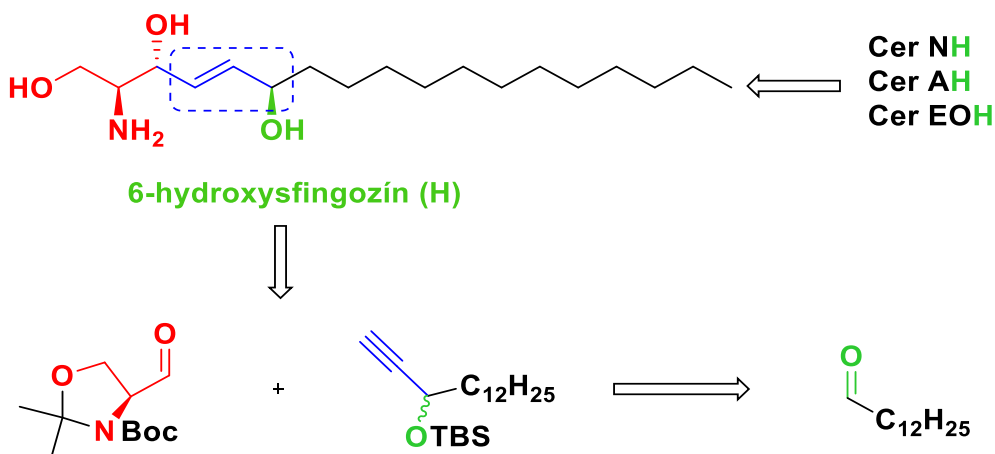


Schéma 1 Štruktúra a retrosyntéza fyziologického 6-hydroxysfingozínu, teda, (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-2-aminooctadec-4-en-1,3,6-triolu a H-Cer

Totálna syntéza (**H**) bola postavená na reakcii komerčne dostupného tridekanálu s trimethylsilyl acetylénom nasledovaná alkynyláciou (*S*)-Garnerovho aldehydu (chránený *L*-serinal) s chránením (*R*)-pentadec-1-yn-3-olom. V ďalšom kroku bola použitá šetrná a selektívna Trostova hydrosilylácia katalyzovaná [Cp**Ru*(CH₃CN)₃]PF₆ s následnou protodesilyláciou.

Na záver, fyziologický H bol pripravený v siedmich reakčných krokoch s celkovým výťažkom 40 %. Táto báza bola ďalej využitá na prípravu CerNH, CerAH a Cer EOH. Okrem toho boli v tejto práci študované aj biofyzikálne vlastnosti CerNH za pomoci modelových lipidových membrán. V týchto experimentoch sme objavili špecifickú konformáciu lipidových reťazcov CerNH, rozdielne fázové prechody CH₂/CD₂ reťazcov, tesné orthorhombické laterálne zloženie a zníženú miesiteľnosť CerNH s ostatnými kožnými lipidmi.

1.2 Abstract

Title of the Master thesis: *Synthesis and evaluation of human 6-hydroxyceramides*

Candidate: *Adam Majcher*

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

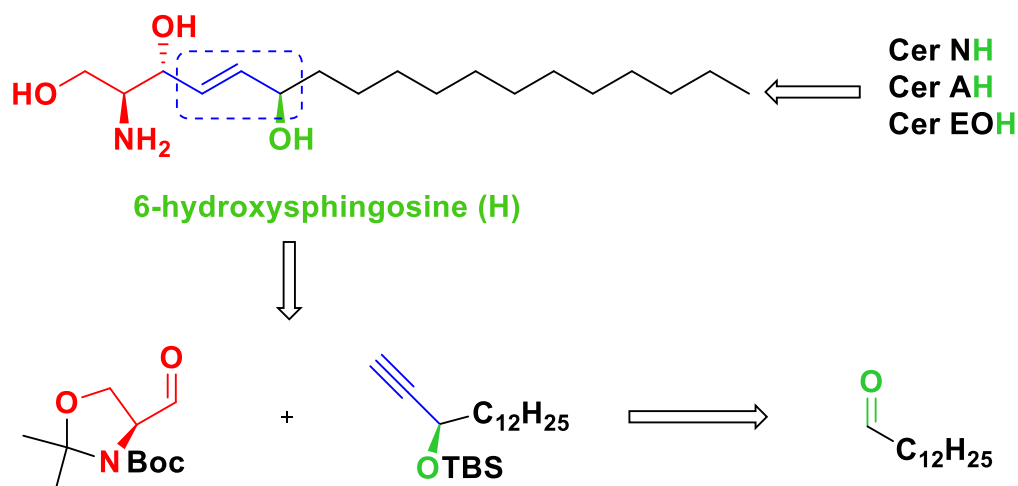
Consultant: *PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.*

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Skin Barrier Research Group, Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Ceramides (Cer), the members of sphingolipid family, occur in all human cells and play an important role in cell signaling. In high concentrations, Cer can also be found in the uppermost layer of epidermis called *stratum corneum*, along with free fatty acids and cholesterol (in equimolar ratio), where they form the intercellular multi-lamellar lipid matrix. The key function of *stratum corneum* is to ensure a permeability barrier, thus, to provide water and electrolyte homeostasis, and to prevent entry of harmful substances into the organism.

Cer are composed of a sphingoid base and an acyl part derived from a long-chain fatty acid. Cer based on 6-hydroxysphingosine (**H**) are amongst the most unusual sphingolipids. In contrast to sphingosine-based Cer, 6-hydroxysphingosine-based Cer (**H-Cer**) are unique for the epidermis and, in addition, H-Cer are not typical for all mammals. Moreover, the function and biosynthesis of H-Cer in the skin is still not completely understood. Several dermatological studies showed that lower concentrations of H-Cer in skin accompany several skin diseases, such as atopic dermatitis. The major limitation of understanding the importance and uniqueness of H-Cer is their commercial unavailability. Therefore, the aim of this work was to explore a new synthetic route towards H as a precursor of all H-Cer subclasses.



Scheme 1. Structure and retrosynthesis of physiological 6-hydroxysphingosine, i.e., (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-2-aminooctadec-4-ene-1,3,6-triol and H-Cer.

The total synthesis of (**H**) was based on the reaction of commercially available tridecanal with trimethylsilyl acetylene. The strategy for the synthesis of **H** involved an alkylation of (*S*)-Garner's aldehyde (a protected *L*-serinal) with protected (*R*)-pentadec-1-yn-3-ol followed by a selective two-step reduction of the triple bond to a *trans*-double bond. In this step, a mild and selective [Cp**Ru*(CH₃CN)₃]*PF*₆-catalyzed Trost's hydrosilylation followed by protodesilylation was used.

In conclusion, physiological **H** has been prepared in seven reaction steps with overall yield 40 %. This base was then used for the preparation of Cer NH, Cer AH and Cer EOH.

Additionally, the phase behaviour and biophysical properties of Cer NH have been studied using model lipid membranes. In these experiments, we discovered a specific CerNH chain order, different phase transitions of CH₂/CD₂ chains, tight orthorhombic lateral packing and decreased miscibility of Cer NH with other skin lipids.

1.3 Úvod a cieľ práce

Ceramidy (Cer) patria do veľkej skupiny látok nazývaných sfingolipidy (SL). Funkcia a význam SL v živých organizmoch bol dlhú dobu záhadou a je dodnes predmetom štúdia mnohých výskumných skupín. Dnes už vieme, že sa SL nachádzajú vo všetkých eukaryotických bunkách a majú nezastupiteľnú úlohu v udržovaní homeostázy organizmu. Zaujímavou je diverzita mechanizmu účinku týchto látok, keďže svoju funkciu naplňajú ako intracelulárne¹, extracelulárne² tak aj v rámci bunkových membrán (hypotéza tzv. lipid rafts).³

Cer tvoria svojim obsahom najpočetnejšiu podskupinu SL. Ich prítomnosť bola popísaná v rôznych častiach ľudského tela. Najčlenitejšie zastúpené rodiny Cer sú v ľudskej koži, kde spolu s voľnými masnými kyselinami (FFA, z anglického free fatty acids), Cholesterolom (Chol) a Cholesterol-Sulfátom (CholS) vytvárajú intercelulárnu lipidovú matrix. Táto lipidová matrix zabezpečuje permeabilitnú bariérovú funkciu kože.⁴

Chemicky sú Cer amidy dlhých aminoalkoholov, tzv. sfingoidných báz. Primárna amínová skupina týchto sfingoidných báz je acylovaná vyššou masnou kyselinou. Poznáme niekoľko sfingoidných báz od ktorých môžu byť Cer odvodené. Medzi najčastejšie zastúpené sfingoidné bázy patria Sfingozín (S), dihydrosfingozín (dS), fytosfingozín (P) a pre ľudskú epidermis špecifický 6-hydroxysfingozín (H). Cer odvodené od tejto poslednej sfingoidnej bázy nazývame 6-hydroxyceramidy alebo H-ceramidy (H-Cer).⁵ K dnešnému dňu bolo popísaných viac ako 12 rodín Cer s rozličnými funkciami.

H-Cer sú pomerne novou skupinou látok, ktorá je zaujímavá hneď z niekoľkých dôvodov. Za prvé boli tieto látky detekované iba v epidermis a iba u niektorých cicavcov (v prasacej epidermis detekované neboli). Za druhé presná funkcia ani biosyntéza doteraz nie je spoľahlivo popísaná a pochopená. Za tretie boli opakovane namerané znížené hodnoty H-Cer pri kožných ochoreniach ako napríklad atopická dermatitída alebo psoriáza čo z nich robí potenciálnych kandidátov pre terapiu alebo diagnostiku týchto ochorení.⁶

Najväčším problémom pri štúdiu H-Cer je, že nie sú komerčne dostupné a ich syntéza je náročná, mnohostupňová a zdĺhavá. Cieľom tejto práce bolo popísať novú syntetickú cestu k H ako prekursoru všetkých známych H-Cer a izolácia H pre ďalšie biofyzikálne a biochemické štúdie. Ďalej je v tejto práci popísaný vplyv H-Cer na biofyzikálne vlastnosti modelových lipidových membrán, ktoré slúžia ako zjednodušený model ľudského SC za účelom hlbšieho porozumenia vzťahu štruktúry a účinku u tejto skupiny kožných lipidov.

2. Teoretická časť

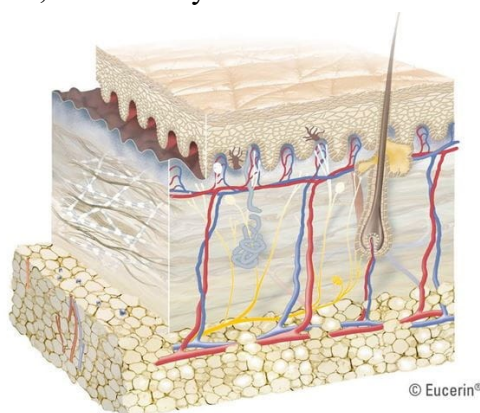
2.1 Koža

Koža (lat. cutis, gr. derma) predstavuje rozsiahly orgán tvoriaci vonkajší povrch tela stavovcov. Jej plocha dosahuje u človeka 1,6-2 m, hrúbku 0,5-4 mm v závislosti od stavby, nutričii a obsahu vody (cca 72 %), a hmotnosť približne 3 kg. Jej vlastnosti závisia od polohy a funkcie. Najsilnejšia koža je na chrbte (spolu s dermis až 4 mm), najsilnejšia epidermis je na dlani (množstvo receptorov - senzorické vlastnosti kože), kdežto najtenšia koža sa nachádza na očných viečkach (0,5 mm). Jedna z hlavných funkcií kože spočíva v jej priamom kontakte s vonkajším prostredím a jeho sprostredkovaní čím prispieva k zachovaniu vnútornej rovnováhy, homeostázy. Konkrétne sa teda jedná o ochranu organizmu pred vonkajšími činiteľmi ako chemickými, fyzikálnymi tak biologickými.⁷ Multifunkčnosť kože je tvorená jej prepojením s ostatnými systémami organizmu, teda s:

- Cievny systémom (termoregulačná f.)
- Nervovým systémom (senzorické f.),
- Imunitným systémom (ochrana pred biologickými agens)⁷

Ďalej koža spĺňa aj funkcie metabolické (tvorba vit. D), exkretčné (tvorba potu), resorpčné a v neposlednom rade funkcie v rámci sociálnej komunikácie (tzv. fyziognómia, mimika ako spôsob emočnej expresie).^{8,9} Schematický náčrt ľudskej kože môžeme vidieť na obrázku 1.

Okrem základných fyziologických funkcií kože je nutné spomenúť aj jej hojivé schopnosti, ktoré taktiež zabezpečujú dlhodobé zachovanie vnútornej integrity v prípade mechanického roztrhnutia kože, teda traumy.^{9,10}



Obrázok 1 Stavba ľudskej kože. Na obrázku môžeme vidieť základné dve vrstvy kože a to epidermis a dermis. Tieto vrstvy sú vystlané podkožným tukovým tkanivom, tela subcutis. Prevzaté z eucerin.sk/o-kozi/zakladne-informacie/struktura-a-funkcie-koze.

2.2 Stavba ľudskej kože

Koža sa skladá z dvoch hlavných stavebných jednotiek a to z epidermis (pokožky) a dermis (corium, zamša) vystlanej podkožným tela subcutanea (tukové väzivo), ktoré zabezpečujú jej prispôsobivosť k rôznym mechanickým vplyvom.^{8,11}

Tela subcutanea

Je väzivo prepájajúce kožu so svalovým alebo kostrovým tkanivom a taktiež miestom ukladania tukového tkaniva ako výstelky pre vyššie časti kože. Jedná sa o najhlbšiu vrstvu kože tvorenú prevažne bunkami typu adipocytov. Adipocyty sú až 100 µm veľké okrúhle bunky, ktorých cytoplazma plná lipidov (triglyceridov, voľných mastných kyselín) tlačí nucleus (bunkové jadro) proti cytosolickej membráne. Funkcia tejto vrstvy kože je termoregulačná, ochranná (voči mechanickým vplyvom) a taktiež nutričná (slúži ako zásobáreň energie).¹¹

Dermis

Je hlbšie položená 0,5-2,5 mm hrubá väzivová vrstva, ktorá je husto vaskulinizovaná a inervovaná. Jej hmota je tvorená rôznymi typmi buniek ako: fibroblastami, dermálnymi dendrocytmi a mastocytmi, ktorých okolie tvorí hlavne fibrilárny kolagén. Svojou elasticitou a tvarovateľnosťou zabezpečuje podporu a ochranu vaskulárneho systému, nervového systému a epidermis.^{8,9,11}

Rozoznávame dve vrstvy a to stratum papillare a stratum reticulare:

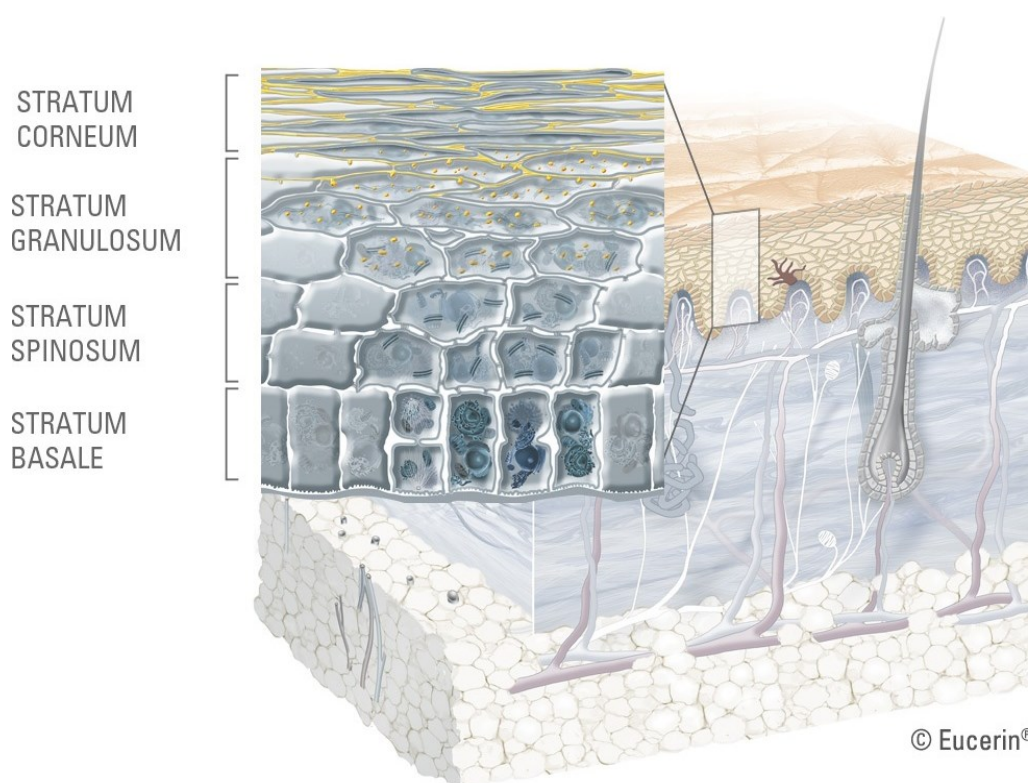
Stratum papillare je tvorená sieťou kolagénnych a elastických vlákien pretkávajúcich priestor medzi väzivovými bunkami. Ďalej v tejto vrstve v rámci prepojenia kože s imunitným a cievnym systémom nachádzame sieť cievnych a lymfatických kapilár. Čo do termoregulačnej funkcie sa práve v tejto vrstve vyskytujú potné žľazy a taktiež vlákna hladkej svaloviny (vzpriamovače chlupov). Táto vrstva taktiež obsahuje exteroceptory:

- *Nociceptory (nervové zakončenia - vnímanie bolesti)*
- *Mechanoreceptory (vnímanie tlaku a dotyku)*
- *Meissnerove, Krauseho, Vater-Pacinniho a Ruffiniho telieska⁹*

Stratum reticulare je tvorená hustými zväzkami kolagénnych fibríl dodávajúca koži pevnosť.⁹

Epidermis

Je najvrchnejšou vrstvou, ektodermálneho pôvodu, histologicky tvorená vrstevnatým dlaždicovým epitelom. Jej zloženie aj hrúbka je variabilná a závisí na funkcii a umiestnení.⁹ Základnými bunkami sú keratinocyty (až 95 %)¹², ktoré sú dopĺňané funkčne pomocnými bunkami ako Melanocytmi, Langerhansenovými bunkami a Merkelovými bunkami. Jednotlivé keratinocyty tvoria smerom k povrchu viacero morfoloicky odlišných vrstiev s rastúcim podielom keratinizácie t.j. so zvýšeným obsahom bielkoviny keratínu v nich. Vlastné bunky epidermis sú prepojené dynamicky sa vyskytujúcimi desmozómami umožňujúcimi kontaktu jednotlivých buniek a ich pohybu smerom k povrchu kože.⁹ V poslednom štádiu sa odlupujú vo forme šupín. Hovoríme o istom životnom cykle bunky, ktorý zaberá v priemere 2-4 týždne. Súčasťou sú aj rohovinové deriváty ako chĺpy (lat. pilli), nechty (lat. unguis, gr. onyx) a kožné žľazy.⁷ Schematický popis epidermis môžeme vidieť na obrázku 2.

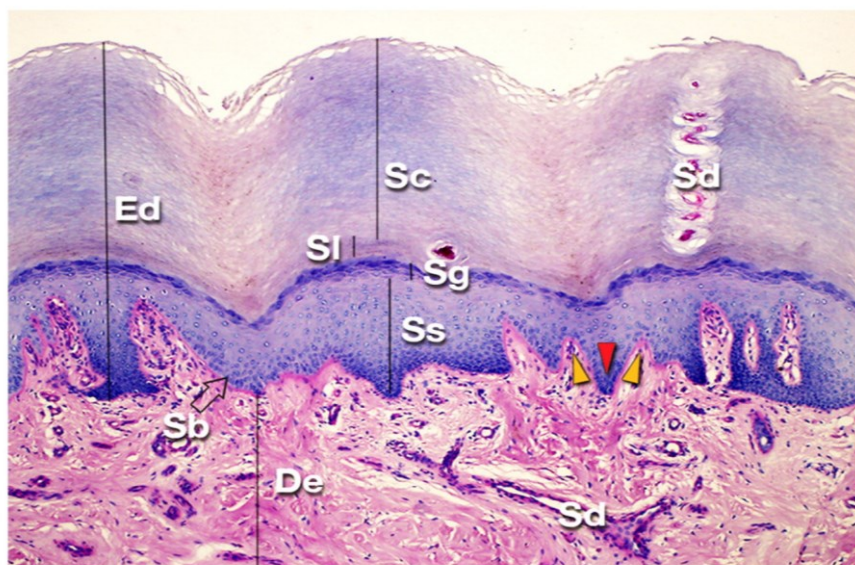


Obrázok 2 Schematický náčrt ľudskej kože s bližšie načrtnutou stavbou epidermis. Na obrázku môžeme vidieť umiestnenie epidermis a taktiež jej jednotlivé vrstvy. Na obrázku nie je znázornené Stratum lucidum, ktoré nie je nutne prítomné vo všetkých oblastiach kože. Prevzaté z eucerin.sk/o-kozi/zakladne-informacie/struktura-a-funkcie-koze.

Epidermis je tvorená:

- **Stratum germinativum**- zárodočná vrstva ktorá sa ďalej skladá zo:
 - **Stratum basale (cylindricum)** - jednobunková vrstva nasadajúca na bazálnu membránu, v ktorej ako jedinej prebieha aktívna proliferácia a vznik nových buniek
 - **Stratum spinosum** - tvorená 2-5 vrstvami novo vzniknutých buniek typického splošteného tvaru
- **Stratum granulosum** - tvorená 1-3 vrstvami buniek s typickými granulami keratohyalínu (prekurzor keratínu). Bunky sa ďalej diferencujú a podliehajú apoptóze.
- **Stratum lucidum** - často nenápadná tenká vrstva, výrazne prítomná hlavne v hrubej koži (dlane, chodidlá), tvorená bezjadrovými bunkami obsahujúcimi eleidín (prekurzor keratínu).
- **Stratum corneum** - najvrchnejšia vrstva epidermis tvorená úplne zrohovatenými bunkami, postupne sa odlupujúcimi vo forme šupín označovanými ako stratum disjunctum.⁹

Histologický rez popisujúce všetky vrstvy epidermis môžeme vidieť na obrázku 3.



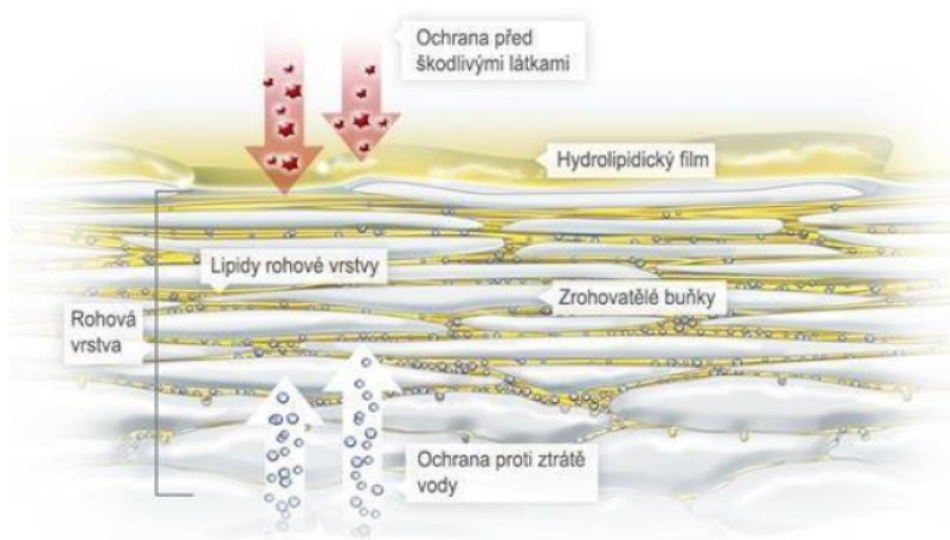
Obrázok 3 Histologický rez ľudskou kožou. Jedná sa o longitudinálny rez hrubou kožou na nohe. Na obrázku môžeme vidieť základných 5 vrstiev epidermis. Červená šípka ukazuje na epidermálny hrebeň (z anglického epidermal ridge), oranžová šípka na dermálnu papilu. Ed značí epidermis; De, Dermis; Sb, stratum basale; Ss, stratum spinosum; Sg, stratum granulosum; Sl, stratum lucidum; Sc, stratum corneum; Sd, (potná žláza, z anglického Sweat gland duct).⁹

2.3 Stratum corneum

Najvrchnejšiu vrstvu epidermis tvorí Stratum corneum (SC). Jedná sa v podstate o integrovaný ochranný systém, ktorý umožňuje život na súši.^{13,14} Hlavnou funkciou SC je teda ochrana tela pred excesívnou transepidermálnou stratou vody (TEWL, z anglického transepidermal water loss) a taktiež ochrana pred vstupom rôznych škodlivých látok do tela.¹⁵

2.3.1 Stavba SC

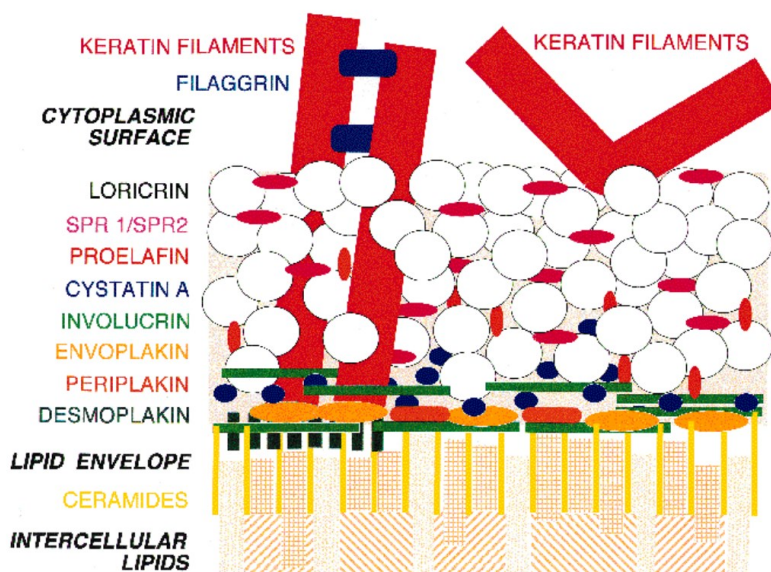
SC sa dá popísať ako 10-25 vrstevný, cca 15 µm hrubý systém, ktorý sa skladá z plošných a zrohovatených buniek - **korneocytov**.¹⁶ Pre tento popis sa často používa aj zjednodušený model tzv. „tehál a malty“, kde „tehly“ zastupujú korneocyty a „maltu“ lipidová matrix.^{17 18} Tento popis je znázornený na obrázku 4.



Obrázok 4 Schematický nákres Stratum corneum (SC). Na obrázku môžeme vidieť základný princíp stavby SC a taktiež pochopiť model „tehál a malty“. Na obrázku sú demonštrované aj dve základné funkcie SC a to ochrana pred vstupom škodlivých látok do organizmu a zabránenie excesívnej strate vody a tým narušenie vnútornej homeostázy. Prevzaté z eucerin.sk/o-kozi/zakladne-informacie/struktura-a-funkcie-koze.

Korneocyty sú ploché vysoko diferencované bunky hexagonálneho tvaru o dĺžke 30-40 µm, pôvodom z eosinofilných keratinocytov.⁸ V cytoplazme korneocytov nie je prítomné bunkové jadro ani bunkové organely. Namiesto toho cytoplazmu tvorí hustá fibrózna spleť zosieťovaných proteínov zo skupiny keratínov.⁹

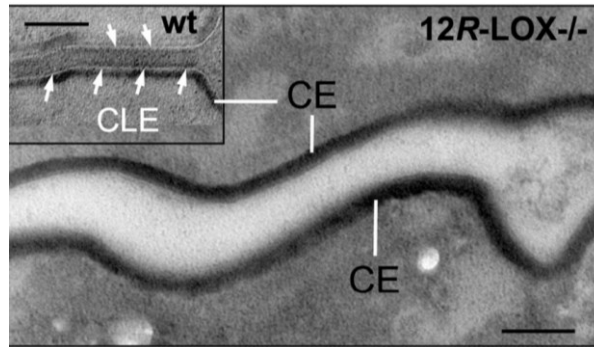
Korneocyty sú navyše medzi sebou prepojené pomocou desmozómov, ktoré sú tvorené bielkovinou *corneodesmosinom*. Na povrchu sú pokryté **tzv. korneocytálnou obálkou (CE, z anglického corneocyte envelope)**, ktorá zabezpečuje spevnenie celého mnohvrstevného systému. Táto krycia vrstva zasahuje hlboko do cytoplazmatickej membrány korneocytov a je tvorená zosieťovanou zmesou bielkovín. Konkrétne sa jedná o bielkoviny ako involukrin, envoplakin, lorikrin, SPR, elafin, fillagrin, cystatin A a iné.^{8,17-19} Schematický náčrt korneocytálnej obálky môžeme vidieť na obrázku 5.



Obrázok 5 Schematický náčrt korneocytálnej obálky aj s proteínmi.¹⁷

2.3.2 Lipidy v SC

Na mnohvrstevný systém CE je kovalentne viazaná vrstva lipidov **tzv. korneocytálna lipidová obálka (CLE, z anglického corneocyte lipid envelope)**, ktorá slúži ako predloha tvorby intercelulárnej (medzibunkovej) lipidovej matrix.²⁰ Táto medzibunková hmota je tvorená hlavne zmesou ceramidov (okolo 50 %, m/m %), voľných mastných kyselín (FFA, z ang. Free fatty acids, 10-20 %) a voľného cholesterolu (Chol, 25 %), ktorá je doplnená ostatnými zložkami ako estery cholesterolu a cholesterol-sulfát (CholS). V menšom množstve sú v SC obsiahnuté aj prekurzory epidermálnych Ceramidov ako napríklad, glukosylované-ceramidy (GlcCer), sfingomyelíny (SM) a iné.² Na obrázku 6 môžeme vidieť snímok z elektrónového mikroskopu zobrazujúci CE a CLE.



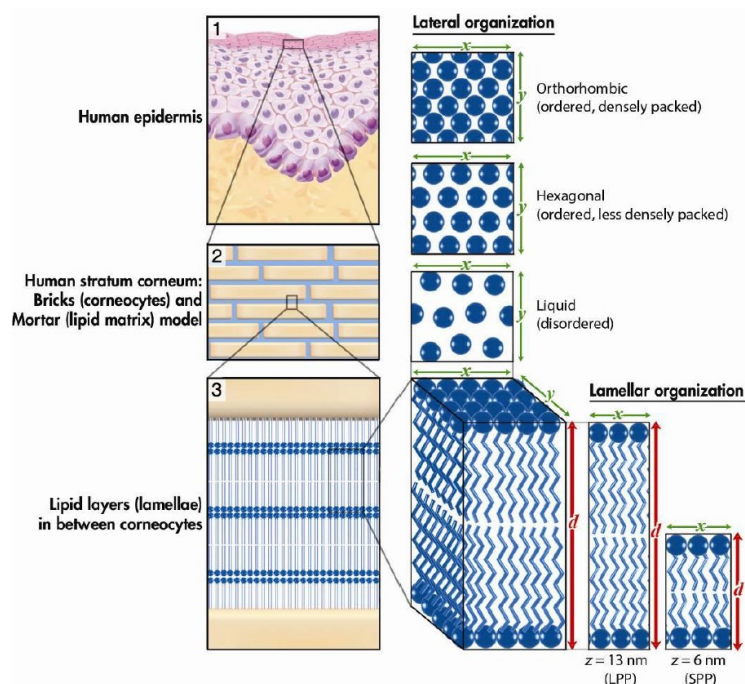
Obrázok 6 Snímok z elektrónového mikroskopu. Veľký obrázok korneocytálna obálka (CE) bez vrstvy korneocytálnej lipidovej obálky (CLE). Malý obrázok vľavo hore CLE spolu s CE.²¹

Napriek tomu, že vyššie spomínaná lipidová matrix tvorí len 20 % celkovej hmotnosti SC je považovaná za esenciálnu zložku kože potrebnú pre správnu funkciu kožnej bariéry.¹⁷

Taktiež zloženie a molekulárne usporiadanie lipidovej matrix je pre správnu funkciu SC zásadné a jej dysregulácia môže viesť k rôznym patológiám ako napríklad atopická dermatitída.²²

2.3.3 Organizácia lipidov v SC

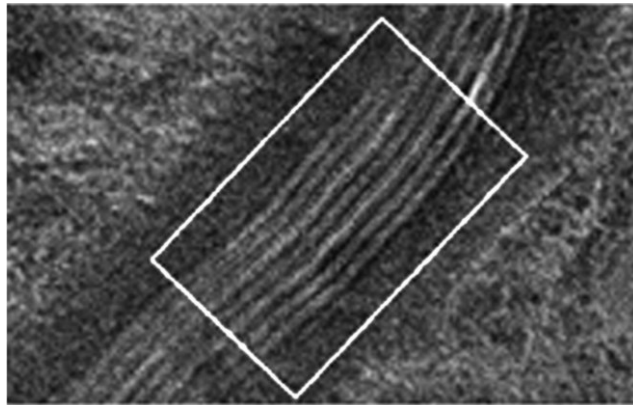
Lipidová intercelulárna matrix v SC má veľmi špecifickú 3D štruktúru. Jej organizácia a funkcia stále nie je úplne pochopená a je predmetom výskumu. Existujú dva princípy ako môžeme lipidovú matrix popisovať a to z pohľadu lamelárneho alebo laterálneho usporiadania. (vid' Obrázok 7)



Obrázok 7 Štruktúra ľudského SC a detailný popis lamelárnej a laterálnej stavby lipidovej matrix⁴

Lamelárne usporiadanie SC

Cer spolu s Chol, FFA, CholS a ostatnými zložkami lipidovej matrix SC prirodzene vytvárajú lamelárne štruktúry. Cer majú oveľa menšiu polárnu hlavu, dlhšie reťazce a menší počet násobných väzieb než fosfolipidy. Prirodzene Cer netvorí dvojvrstvy ale práve popisované viacvrstevné štruktúry (lamely). Cer orientujú svoje hydrofóbne reťazce do vnútra lamiel a polárne hlavy smerom von.²³ Na obrázku 8 môžeme vidieť intercelulárny priestor aj s charakteristickým lamelárnym usporiadaním.^{4,24}

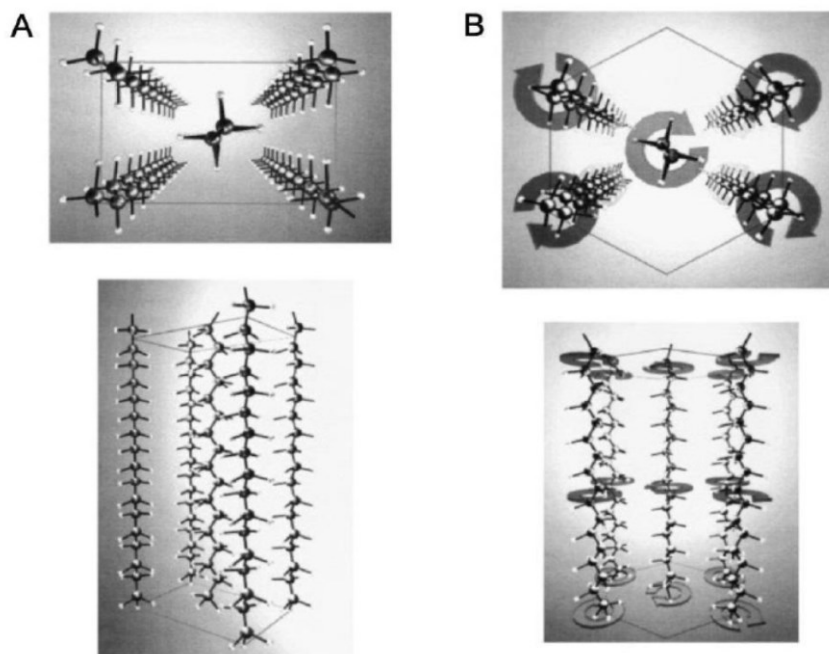


Obrázok 8 Intercelulárny priestor SC tvorí typickú lamelárnu štruktúru medzi dvoma korneocytmi. Zobrazenie pomocou kryo-elektrónovej mikroskopie.⁴

Vzniknuté lamelárne štruktúry delíme podľa ich šírky. Lamely, ktoré majú šírku 11,9-13,1 nm označujeme ako dlhá periodická fáza (LPP, z anglického long periodicity phase) a lamely so šírkou 5,3-6,4 nm ako krátka lamelárna fáza (SPP, z anglického short periodicity phase). Nákres a popis týchto lamelárných fáz môžeme vidieť na obrázku 7. Medzi hlavné metódy štúdia lamelárneho usporiadania lipidových membrán patrí Röntgenová a Neutrónová difrakcia.^{25,26}

Laterálne usporiadanie SC

Organizáciu lipidov v lamelách môžeme taktiež popisovať z pohľadu laterálneho usporiadania. Poznáme tri typy takéhoto usporiadania. Tesné a pevné **Orthorhombické usporiadanie** (Obrázok 9A) reťazcov v *all-trans* (syn. *Cik-cak*) konformácii, ktoré prakticky neumožňuje ich rotáciu ani ich laterálne pohyby (napr. difúzia). Voľnejšie **Hexagonálne usporiadanie** (Obrázok 9B), ktoré už rotáciu a mobilitu lipidov umožňuje, a **kvapalno-kryštalickú fázu** v ktorej je väčšina reťazcov vo voľnej *Gauche* konformácii.^{4,23,27}



Obrázok 9 (A) Laterálne usporiadanie reťazcov Cer do Ortorombickej mriežky (horný obrázok) v *all-trans* konformácii (dolný obrázok); (B) Laterálne usporiadanie reťazcov Cer do Hexagonálnej mriežky (Horný obrázok) v tzv. *Gauche* konformácii (dolný obrázok).²⁷

V zdravom ľudskom SC môžeme nájsť všetky tri fázy avšak najtesnejšie **Orthorhombické usporiadanie prevažuje**.²⁸ Napriek tomu, že kvapalno-kryštalická fáza sa vyskytuje minimálne môže dodávať koži elasticitu ako tomu je u bunkových membrán živých buniek.²³

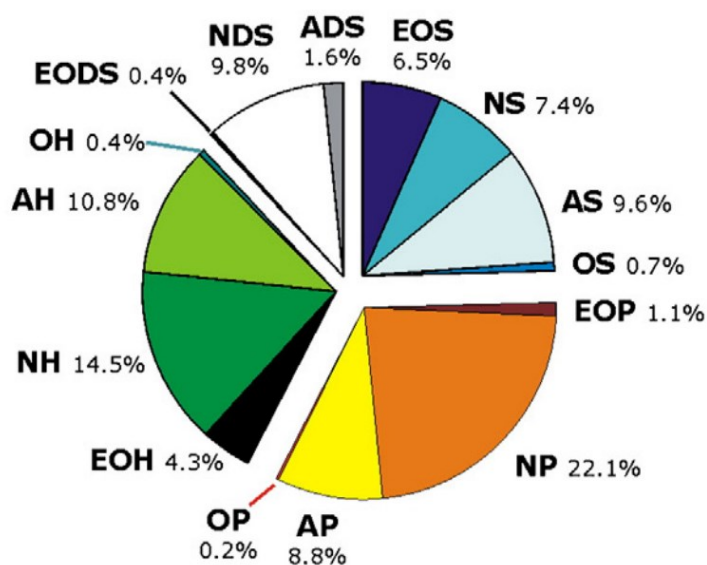
Jednou z najčastejších metód pre štúdium laterálneho usporiadania SC je infračervená spektroskopia zoslabeného odrazu spojená s Fourierovou transformáciou (ATR-FTIR spectroscopy)²⁹, ktorá bola použitá aj v Experimentálnej časti tejto práce.

2.4 Ceramidy

Ceramidy (Cer) patria do rodiny sfingolipidov, teda látok odvodených od sfingozínu. Ich funkcia v organizme je veľmi široká a doteraz ešte nie úplne pochopená. Intracelulárne sa Cer podieľajú na regulačných a adaptačných bunkových procesoch.^{1,30} Extracelulárne ich funkciu nachádzame na rôznych miestach v nervovom systéme^{31,32} alebo kožnej bariére.^{33,34}

2.4.1 Nomenklatúra a chemická štruktúra

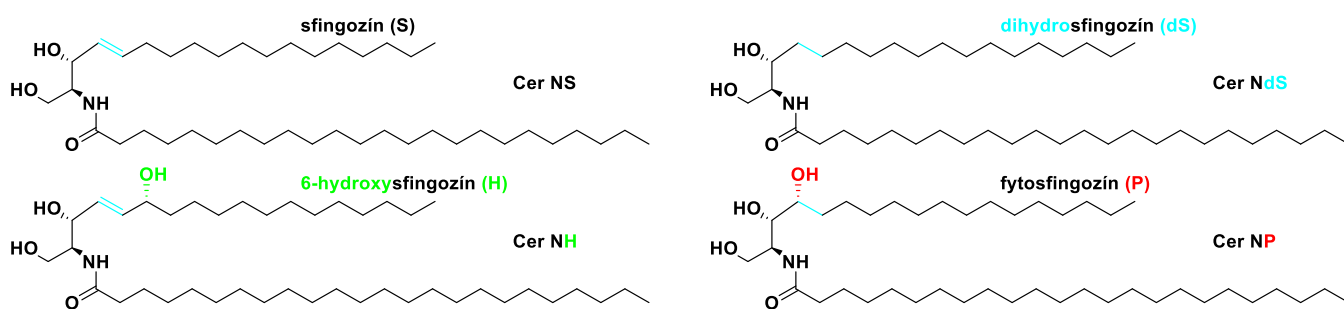
Cer sa skladajú zo sfingoídnej bázy a acylového reťazca. Chemicky sa teda jedná o amidy mastných kyselín a bázického aminoalkoholu s dlhým reťazcom (14-28C).⁵ V tejto dobe poznáme 4 typy základných sfingoidných báz a to sfingozín (S), fytosfingozín (P), dihydrosfingozín (dS) a pre túto prácu najpodstatnejší 6-hydroxysfingozín (H). Primárna amino skupina týchto sfingoidných báz je acylovaná nenasýtenou (N), α -hydroxylovanou (A) alebo ω -hydroxylovanou (O) kyselinou. Cer môžu byť ďalej esterifikované v ω -polohe kyselinou linolovou (za vzniku ω -esterifikovaných acylov, EO)³⁵ alebo v polohe 1 nesubstituovanou kyselinou za vzniku 1-O-AcylCer.³⁶ Relatívne zastúpenie všetkých typov epidermálnych Cer môžeme vidieť na obrázku 10³⁷ a štruktúry základných Cer na obrázku 11.



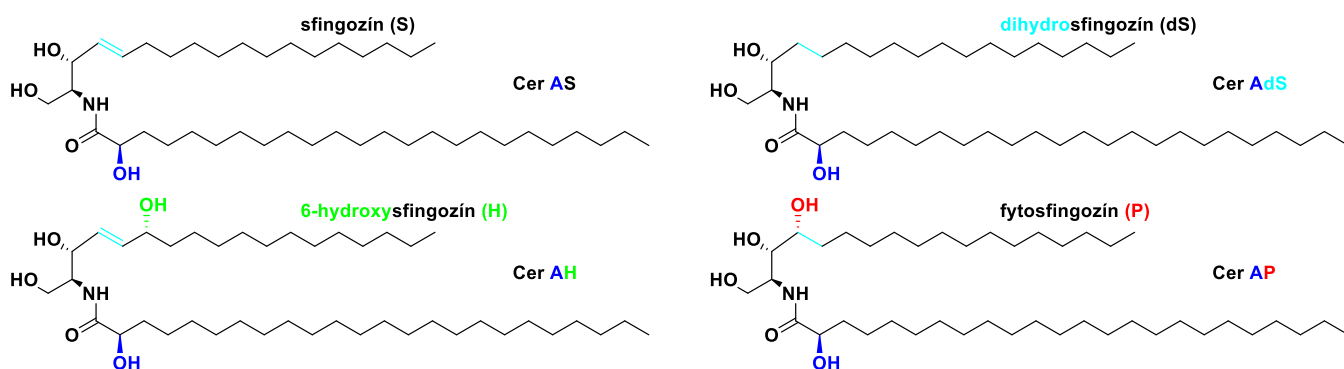
Obrázok 10 Koláčový graf znázorňujúci relatívne zastúpenie základných epidermálnych Cer.³⁷

Dĺžka acylu sa môže líšiť v závislosti na polohe v ľudskej koži. Všeobecne by šlo tvrdiť, že dĺžky acylov Cer v ľudskom SC sa pohybujú od 16 do 36C. Pre správnu funkciu ľudskej kože je dôležitá prítomnosť polárnych funkčných skupín ale aj dĺžka reťazcov.¹⁸

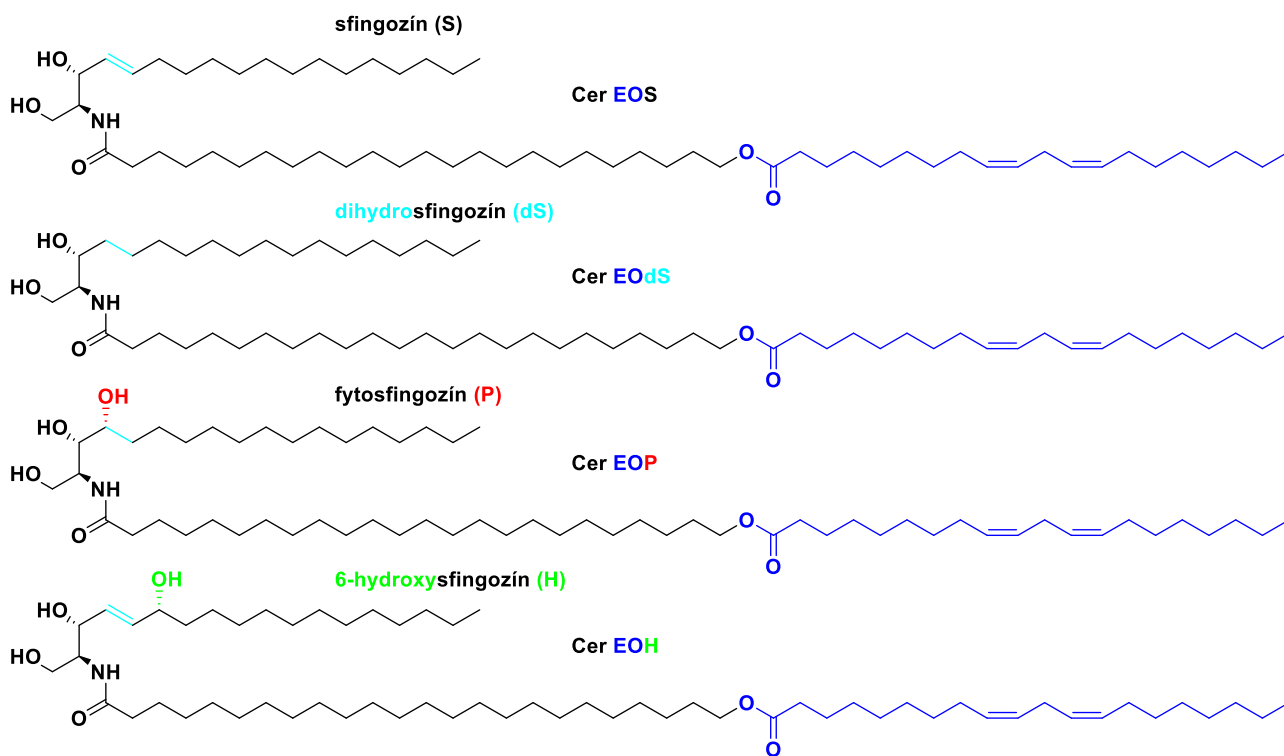
Ceramidy s nesubstituovaným acylom (N)



Ceramidy s α -hydroxylovaným acylom (A)

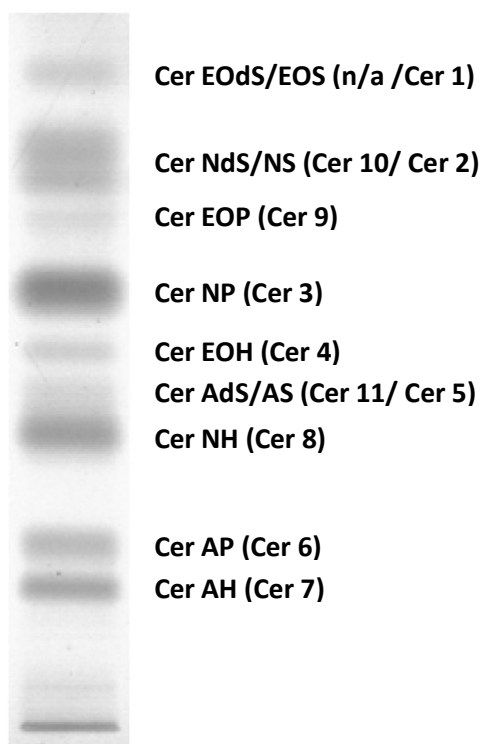


Ceramidy s ω -esterifikovaným acylom (EO)



Obrázok 11 Prehľad základných 12 typov Cer

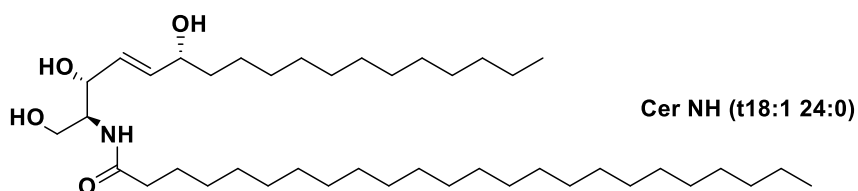
Existuje niekoľko nomenklatúrnych prístupov pre tieto štruktúry. Najpoužívanejší je však systém podľa Motty, ktorý popisuje Cer kombináciami vyššie uvedených písmen.³⁸ Názov vzniká priradením príslušného písmena sfingoídnej bázy k písmenu acylu. Teda pri označení Cer AP nám vzniká Ceramid odvodený od fytosfingoínu (P), ktorého acyl je tvorený α -hydroxylovanou (A) mastnou kyselinou. Obdobne môžeme vytvoriť názvy všetkých 12-tich základných podtried Cer.⁵



Nomenklatúra podľa Motty, bola navrhnutá už v roku 1993³⁸ a následne doplnená v roku 1994³⁹ a 2014.⁵ Toto názvoslovie nahradilo pôvodnú číselnú nomenklatúru, ktorá pomenúvala Cer priradením čísla podľa hodnoty Rf pri chromatografickom rozdelení epidermálnych Cer na HPTLC (High performance thin layer chromatography) doskách. Pomenovanie podľa tohto systému môžeme vidieť na obrázku 12 v zátvorkách.⁴⁰ Keďže so zlepšením analytických metód boli objavené nové typy Ceramidov, starý systém nomenklatúry už nebol prehľadný.

Obrázok 12 Rozdelenie Epidermálnych Ceramidov na HPTLC a pomenovanie príslušných Cer pomocou dvoch nomenklatúr. Pred zátvorkou je názov podľa Motty a v zátvorke podľa predošlého číselného nomenklatúrneho systému. Cer EODS nemá číselné označenie.⁴⁰

Dodatočne môžeme do názvu Cer doplniť aj informáciu o dĺžke reťazca a počte dvojných väzieb. Platí, že na prvom mieste sa udáva informácia o sfingoídnej báze a na druhom o acyle.^{5,6} Takýmto štýlom nám vzniká napr. Cer NH (t18:1, 24:0), teda Cer tvorený 6-hydroxysfingoínom o dĺžke 18C a nasýtenou mastnou kyselinou o dĺžke 24C (viď príklad 1).

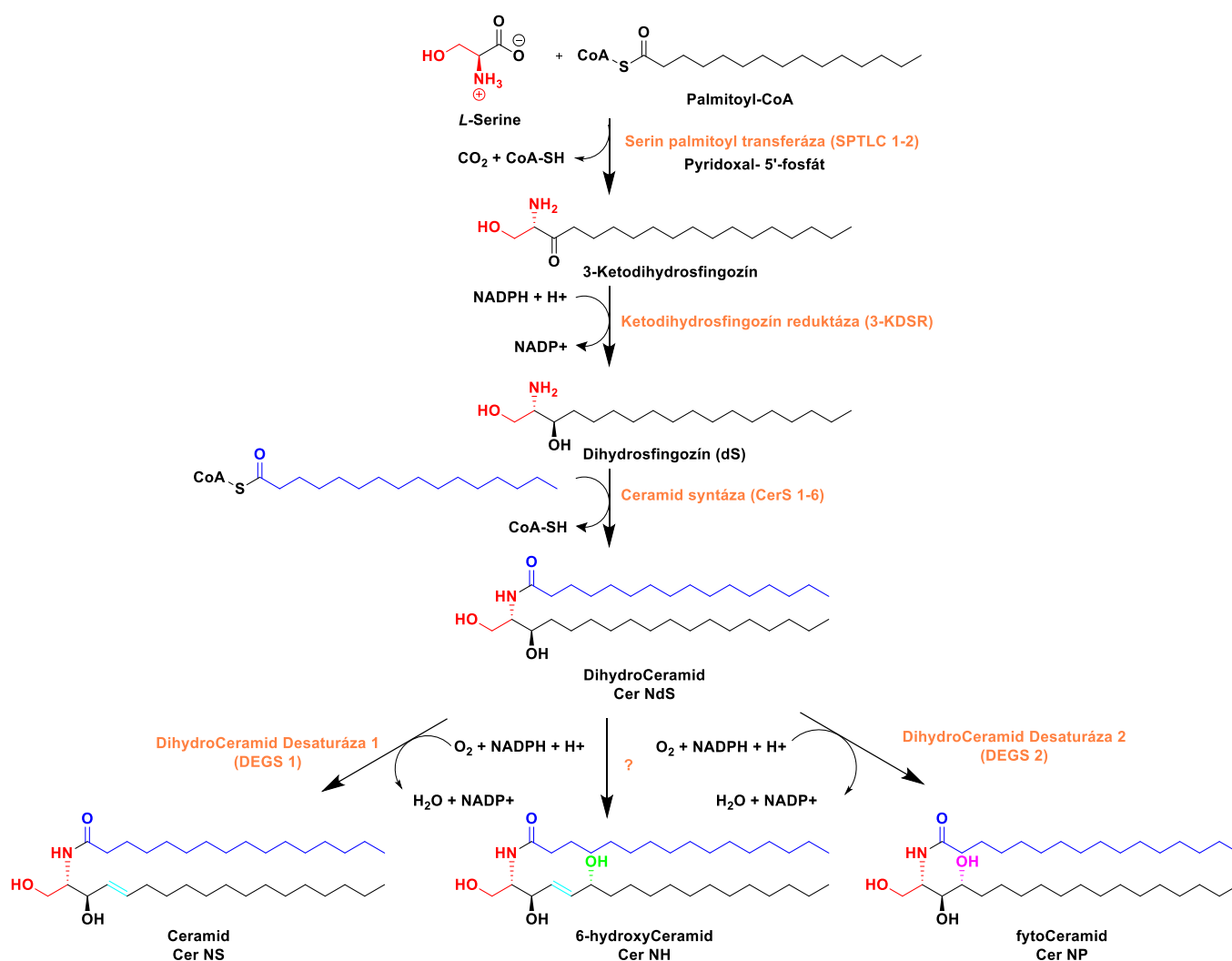


Príklad 1 Pomenovanie Cer podľa Motty s dodatočným pomenovaním dĺžky reťazca

2.4.2 De novo Biosyntéza Ceramidov

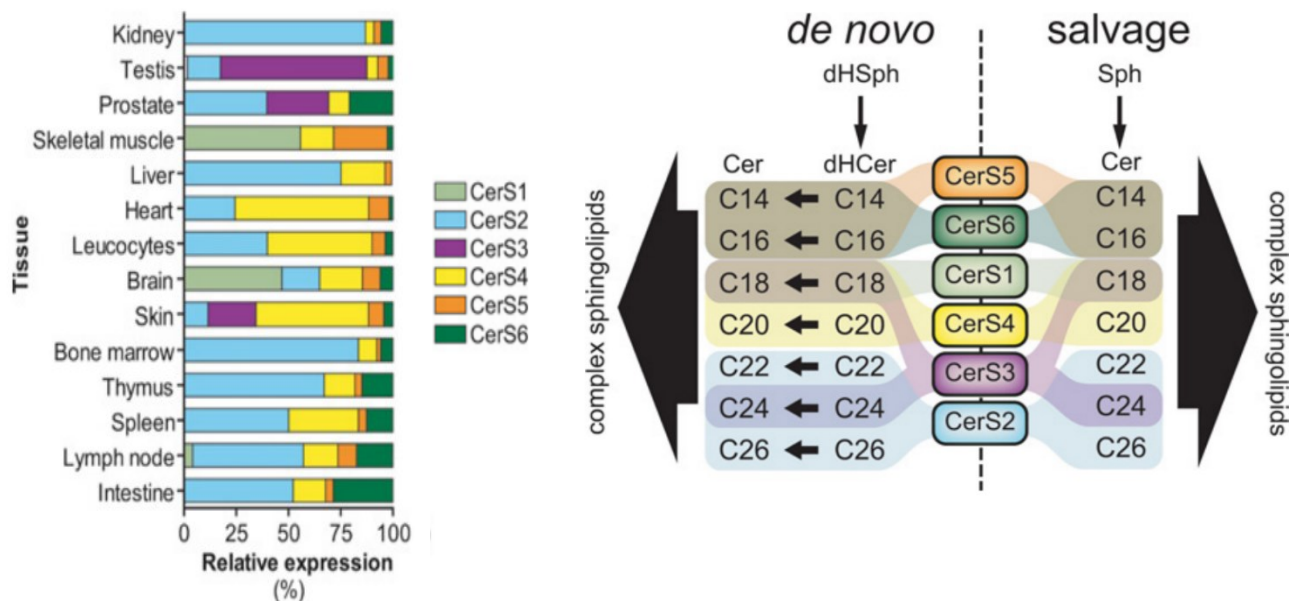
De novo biosyntéza Cer má špeciálne postavenie na pomedzí dvoch biochemických dráh a to metabolizmu mastných kyselín a aminokyselín a prebieha hlavne na endoplazmatickom retikulu.⁴¹ Typicky táto dráha začína konjugáciou *L*-Serínu a Palmitoyl-CoA. Reakcia prebieha za katalýzy pyridoxal-6-fosfát dependentným enzýmom *Serín Palmitoyl transferáza* (SPTLC), za vzniku 18C sfingoidného skeletu, 3-Ketodihydrosfingosínu (3-KDS). Jedná sa o tzv. rate-limiting step, čiže reakcia určujúca rýchlosť celkovej biosyntézy.⁴²

Popis de novo biosyntézy Cer môžeme vidieť na obrázku 13.



Obrázok 13 De novo biosyntéza základných typov Cer

V ďalšom kroku enzým *3-ketodihydrosfingozín reduktáza (3-KDSR)* veľmi rapídne redukuje C3 karbonylovú skupinu 3-KDS na alkoholickú za vzniku dihydrosfingozínu (dS).⁴³ dS ďalej slúži ako substrát pre rozličné (dihydro)Ceramid syntázy (CerS), ktoré katalyzujú pripojenie Acylu mastnej kyseliny na primárnu aminovú skupinu dS. Doposiaľ bolo identifikovaných 6 podskupín CerS (CerS 1-6), ktoré sa líšia mierou expresie v rôznych tkanivách (viď Obrázok 14). Aj napriek tomu, že sa substráty týchto enzýmov prekrývajú, vykazuje každý enzým preferenciu voči dĺžke acylu, prípadne stupni nenasýtenosti.⁴⁴⁻⁴⁶



Obrázok 14 Schéma vľavo: Relatívne rozloženie expresie šiestich izoform Ceramid Syntáz (CerS 1-6) v závislosti na type tkaniva. V koži sa jedná hlavne o expresiu CerS3 a CerS4. Schéma vpravo: Afinity CerS k rôznym acylom mastných kyselín. V koži najviac exprimované enzýmy CerS3 a CerS4 majú vyššiu afinitu k dlhším acylom C18 až C24 čo sa odzrkadľuje aj na dĺžke reťazcov výsledných epidermálnych Cer.⁴⁴

Posledným krokom je úprava sfingoídnej časti. Cer odvodené od sfingozínu získavajú *trans*-dvojnú väzbu na C4-C5 pôsobením desaturázy 1 (DEGS1). Tento enzým v prvom kroku vnesie do pozície 4 hydroxylovú skupinu, ktorá je následne dehydratovaná za vzniku C4-C5 dvojnej väzby.^{47,48} Cer odvodené od fytosfingozínu sú za pomoci enzýmu desaturázy 2 (DES2) hydroxylované v pozícii C4. Enzýmy zodpovedné za syntézu Cer odvodených od 6-hydroxysfingozínu zatiaľ neboli objavené.^{5,49}

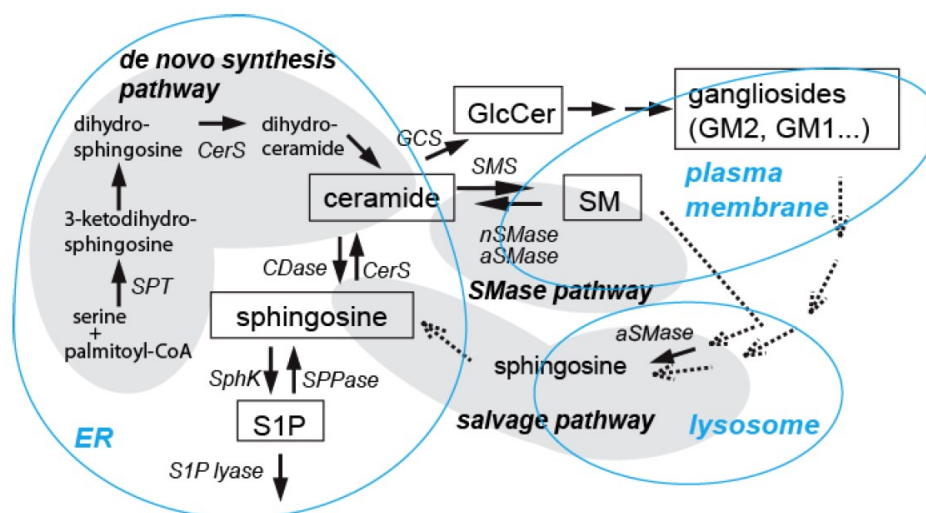
2.4.3 „Salvage pathway“ biosyntézy Ceramidov

Okrem spomínanej *de novo* biosyntézy sú predmetom štúdia aj alternatívne cesty tvorby Cer. Táto dráha prebieha hlavne v kyslých subcelulárnych kompartmentoch ako sú **lyzozómy a pozdné endozómy**. Na začiatku tejto dráhy stoja GlcCer, komplexné sfingolipidy (Glykosfingolipidy) a SM. Tieto sfingolipidy pochádzajú hlavne z cytoplazmatickej membrány. Biochemicky sa jedná o recykláciu komplexných sfingolipidov „naspät“ na **sfingozín**. Takto vzniknutá sfingoidná báza je acylovaná CerS za vzniku Cer. Je nutné podotknúť, že na rozdiel od *de novo* biosyntézy, do acylačnej reakcie namiesto dihydrosfingozínu dS vstupuje sfingozín. Dokonca je „salvage pathway“ hlavným zdrojom voľného S v cytoplazme, kdežto väčšina voľného dS pochádza zo syntézy *de novo*. To do akej miery táto dráha prispieva k tvorbe kožnej bariéry zatiaľ nie je známe.⁵⁰

2.4.4 Sfingomyelinázová dráha biosyntézy Ceramidov

Tretou dráhou biosyntézy Ceramidov je tzv. Sfingomyelinázová dráha. Ako názov naznačuje táto dráha spracúva sfingomyelin obsiahnutý v **bunkových membránach priamo na Cer**. Jedná sa o hydrolytický rozklad SM na Cer a fosforyl cholín za katalýzy enzýmov zo skupiny sfingomyelináz. Rozlišujeme dva základné typy týchto enzýmov, kyslé sfingomyelinázy (aSM) a neutrálne sfingomyelinázy (nSM). Tieto enzýmy sa líšia svojou stavbou, kofaktormi a taktiež svojou lokalizáciou v bunke.⁵¹

Prehľad všetkých dráh a taktiež metabolizmu Cer môžeme vidieť na obrázku 15.



Obrázok 15 Popis všetkých troch dráh biosyntézy Cer. Na obrázku je možno vidieť aj cestu degradácie Cer cez rozklad na sfingozín, fosforyláciu na sfingozín-1-fosfát (S1P) a v ďalšom kroku rozklad až na konečné produkty hexadekanál a fosfoetanolamín.⁵²

2.4.5 Ceramidy a vznik kožnej bariéry

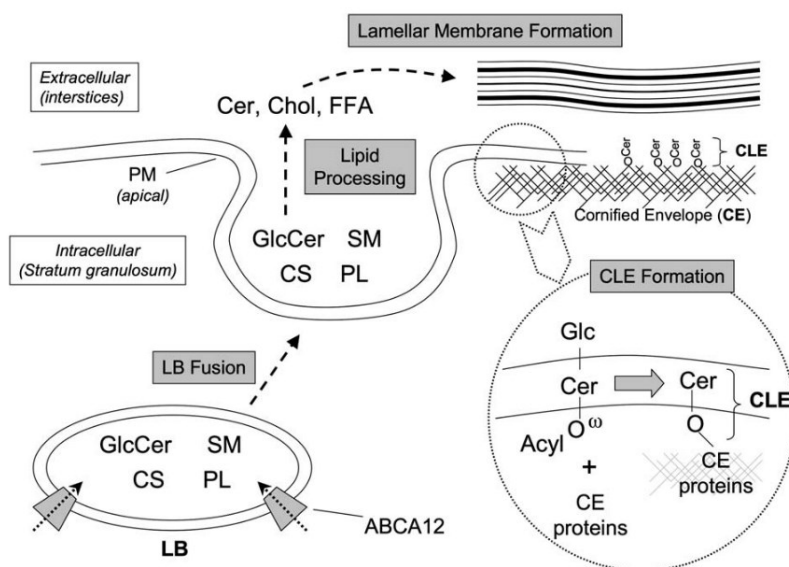
Vznik kožnej bariéry je spájaný s vytvorením správnej intercelulárnej lipidovej matrix. Tento proces začína už v stratum basale pokračuje cez stratum granulosum až po SC a je zobrazený na obrázku 16. Celý proces môžeme rozdeliť do 4 krokov.

1.) Prvým krokom je syntéza lipidov. Z dôvodu nízkej rozpustnosti v cytoplazme a taktiež prevencie cytotoxických účinkov sú Cer ďalej procesované v Golgiho aparáte na Glukosylované Cer (GlcCer) a Sfingomyelíny (SM).⁵

2.) V kroku druhom prebieha tvorba **lamelárnych teliesok**. Tieto lamelárne telieska sú sekretórne organely v ktorých sú uložené všetky epidermálne lipidy, GlcCer a SM ale taktiež katabolické enzýmy. Porucha v tvorbe týchto organel spôsobuje rôzne typy Harlekýnskej ichthyózy. Tieto patológie sú spôsobené mutáciou v géne pre transportný proteín ABCA12, ktorý je znázornený na obrázku 16.⁵³

3.) Tretím krokom je transport a splynutie lamelárnych teliesok s plazmatickou membránou korneocytov a vyliatie obsahu teliesok do intercelulárneho priestoru. Tento krok prebieha približne na úrovni stratum granulosum.

4.) Posledným krokom je premena polárnych lipidových prekurzorov na finálne nepolárne epidermálne lipidy. Táto premena spočíva v prevedení prekurzorov ako GlcCer za katalýzy GlukoCerebrosidázou a SM za katalýzy Sfingomyelinázou na Cer. Fosfolipidy sú prevedené na voľné mastné kyseliny za katalýzy fosfolipázou.



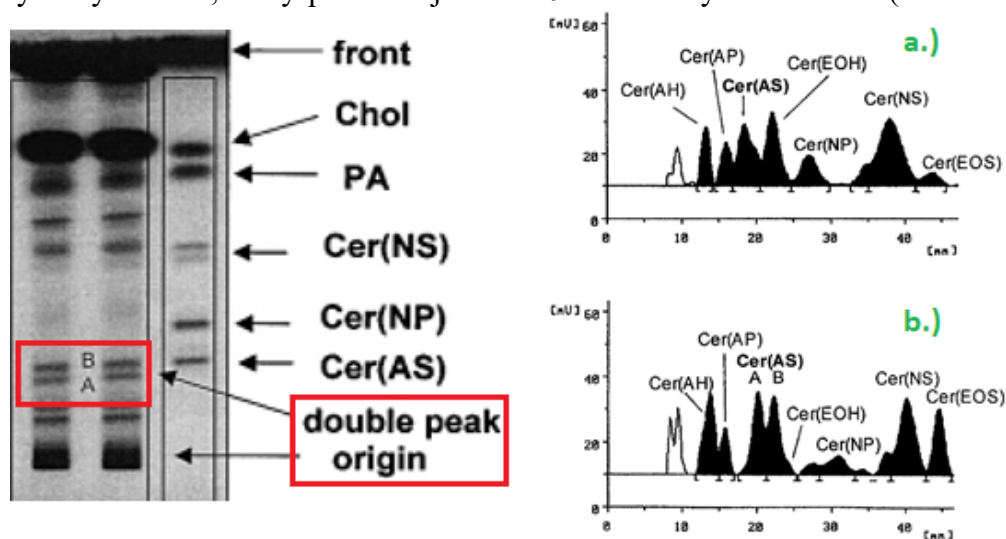
Obrázok 16 Názorný nákres vzniku kožnej bariéry. CS - Cholesterol-sulfát, PL - fosfolipidy LB - lamelárne teliesko.²

2.5 H-Ceramidy

H-Cer sú látky odvodené od 6-hydroxysfingozínu (H) a v nomenklatúre podľa Motta im je priradzované písmeno H.⁶ Typicky nachádzame sfingoidné bázy rozšírené po celom tele, avšak (H) bol zatiaľ pozorovaný iba v koži.³⁹ Doteraz nie je pochopené prečo ľudská koža syntetizuje tieto látky s vyšším počtom hydroxylových skupín, ktoré zvyšujú polaritu inak nepolárnych látok.

2.5.1 Objav (H) a H-Cer

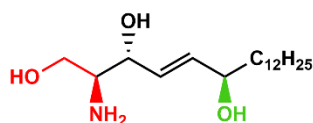
Prvý krát boli nezvyčajné sfingolipidy s tromi hydroxylovými skupinami popisované už v roku 1989.⁵⁴ Pozícia tohto hydroxyly bola však predpokladaná na C4. V roku 1992 boli publikované dáta, ktoré ukazovali na prítomnosť trojhydroxylovaných mononenásýtených sfingoidných báz, konkrétne (t17:1, t18:1, t20:1).⁵⁵ Poloha tretej hydroxylovej skupiny v polohe C6 bola objavená v roku 1994. Skupina Donald T. Downinga na základe NMR spektroskopie lipidov v SC taktiež popísala nové Cer, odvodené od tejto C6 hydroxylovanej sfingoidnej báze a navrhla pridať písmeno (H) do nomenklatúry podľa Motta. Takto popísané H-Cer teda dostali názov Cer EOH, Cer AH a kovalentne viazaný Cer OH.³⁹ V roku 1995 rovnaká skupina taktiež reportovala objav významných hladín (H) v ľudskej epidermis (až 15 % celkových sfingoidných báz). Posledný člen tejto rodiny Cer NH, bol objavený v roku 1999, taktiež Downingovou skupinou.⁵⁶ Problematickou pre objav tohto Cer bola rovnaká retencia CerAS s Cer NH (izoméry, rovnaký počet OH skupín a násobných väzieb). Teda pri rozdelení jednej „škvrny“ Cer AS na dve pomocou zvýšenia polarizácie HPTLC systému mohol byť popísaný nový CerNH, ktorý predstavuje okolo 9 % celkových Cer v SC (viď Obrázok 17).^{56,57}



Obrázok 17 Na HPTLC doske vľavo môžeme vidieť rozdelenie epidermálnych Ceramidov pacienta s atopickou dermatitídou. Vpravo vidíme dva chromatogramy získané denzitometricky z dosky vľavo. Na chromatograme a.) vidíme záznam s pôvodnými chromatografickými podmienkami a b.) rovnaký extrakt s polárnejšou mobilnou fázou. Na chromatograme je vidieť rozdelenie píky CerAS na dva píky A a B.⁴⁹

2.5.2 Bioorganický pohľad na H-Ceramidy

Ako je uvedené na začiatku tejto kapitoly H-Cer sú unikátne tým, že namiesto sfingozínu je ich amínová časť molekuly tvorená 6-hydroxysfingozínom (viď Príklad 2).



Príklad 2 Štruktúra 6-hydroxysfingozínu

(2S,3R,4E,6R)-2-aminooktadec-4-én-1,3,6-triol alebo 6-hydroxysfingozín (H) má na rozdiel od ostatných sfingoidných báz navyše jednu hydroxylovú skupinu v polohe C6. To ako je do molekuly táto alkoholová skupina vnesená *in vivo* nie je spoľahlivo dokázané, avšak predpokladá sa účasť enzýmu podobnému Desaturáze 2 (DEGS2).⁶

Pridaním tejto allylickej hydroxylovej skupiny v molekule vzniká ďalšie centrum chiralít. Platí, že všetky sfingoidné bázy cicavcov sú v usporiadaní *D-erythro*, v absolútnej konfigurácii (2*S*, 3*R*) (až na fytosfingozín, ktorý má absolútnu konfiguráciu (2*S*, 3*S*) z dôvodu zmeny priority substituentov). Absolútna konfigurácia (H) bola dokázaná až pri porovnaní ¹H NMR spektier synteticky pripravených acetylovaných (6*S*) a (6*R*) derivátov H-Cer a acetylovaných derivátov prírodných H-Cer.^{58,59} Finálna konfigurácia (H), vyskytujúceho sa v ľudskej koži, je teda (2*S*, 3*R*, 4*E*, 6*R*).

2.5.3 H-Cer a kožné ochorenia

Zloženie a usporiadanie lipidov v SC u zdravých jedincov sa často líši od tých s kožnou patológiou. Keďže Cer tvoria až 50 % všetkých intercelulárnych lipidov v SC je logické domnievať sa, že porucha ich funkcie môže viesť ku kožným abnormalitám. Výkyvy v hladinách Cer boli opakovane pozorované v prípade rôznych kožných ochorení. Príklady týchto ochorení môžeme vidieť v tabuľke 1.

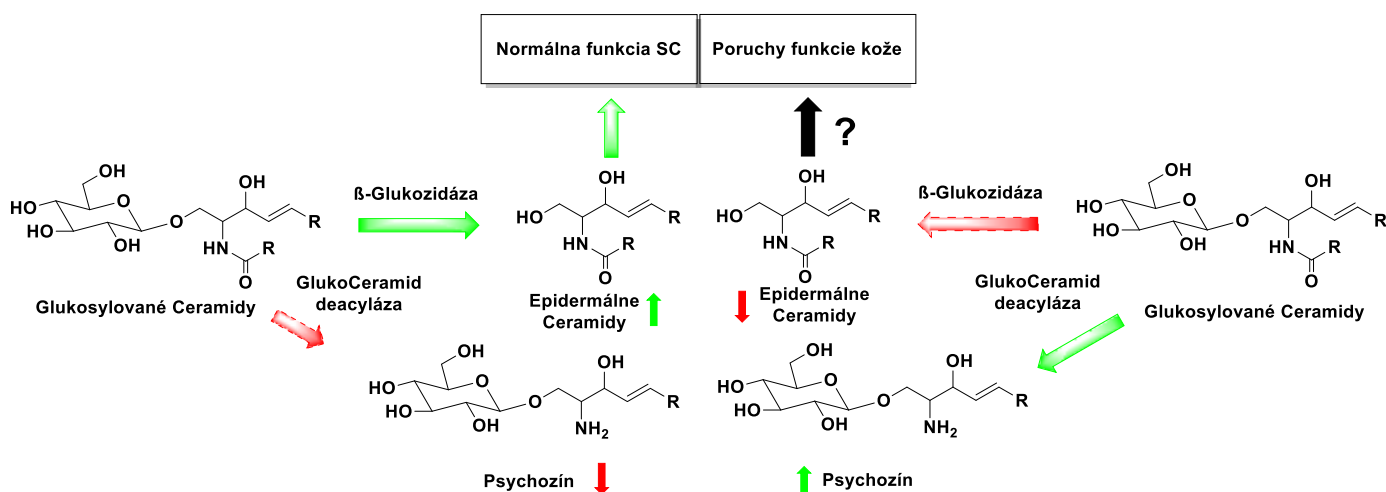
Ochorenie	Zmena hladiny epidermálnych Cer
Lamelárna Ichtyóza	Cer NP↓, Cer EOS ↓
Psoriáza	Cer EOP↓, Cer NP↓, Cer AP↓, Cer AS↑, Cer NS↑
Nethertonov syndróm	Cer EOH ↓, Cer EOS↓, Cer EOP↓, Cer EOdS↓, Cer NP↓, lipidy s krátkymi reťazcami↑, nenasýtené lipidy↓
Atopická dermatitída	Cer EOH ↓, Cer NH ↓, Cer EOS↓, Cer EOP, Cer AH ↑, Cer AS↑, Cer AP↑, Cer AdS↑

Tabuľka 1 Príklady kožných ochorení asociovaných so zmenou v zložení epidermálnych lipidov⁴

Celkovo znížené hladiny Cer v SC boli popisované v prípade pacientov s atopickou dermatitídou.^{6,32,60}

Účasť H-Cer v kožných ochoreniach bola popisovaná hneď od ich objavenia. Najprv bola pozorovaná 5-násobne znížená koncentrácia 6-hydroxylovanej sfingoídnej bázy, konkrétne t20/1, v koži s atopickou dermatitídou (AD). V suchej koži bol pozorovaný pokles Cer EOH, Cer EOS kompenzovaný zvýšenou hladinou Cer NS a Cer AS (CerNH nebol popisovaný a mohol teda koeluovať s CerAS).⁶¹ Markantne znížené hladiny kovalentne viazaných Cer a taktiež voľných Cer ako Cer EOH, Cer AP boli namerané v koži pacientov s AD.⁶² Pomocou LCMS bola dokázaná znížená hladina Cer EOH, EOS, EOP a zvýšená hladina CerAP a CerAH v koži s AD.⁶³ Taktiež bola dokázaná korelácia medzi známymi prediktívnymi faktormi AD (TEWL, závažnosť ochorenia podľa SCORAD systému, mutáciami v géne kódujúcom fillagrin) a zložením Cer v SC. Takto boli asociované znížené hladiny Cer NH, Cer EOH, Cer NP, Cer EOP a zvýšené hladiny Cer AH, AS a NS s výskytom atopickej dermatitídy. Navyše bolo dokázané, že aj dĺžka reťazcov týchto Cer môže byť spoľahlivým ukazovateľom funkcie kožnej bariery.⁶⁴ Tieto dáta poukazujú na skutočnosť, že suplementácia Cer v SC môže byť v budúcnosti použitá k liečbe kožných ochorení.

Okrem celkového zloženia lipidov v SC atopikov boli popísané aj zmeny v epidermálnom metabolizme. Zo sfingolipidového metabolizmu sa ukazujú ako významné hlavne enzýmy sfingomyelin (SM) deacyláza a glukosylceramid (GlcCer) deacyláza, ktorých zvýšená funkcia najviac korelovala s výskytom AD. Príklad 3 popisuje možný mechanizmus tejto korelácie.^{60,65}



Príklad 3 Vľavo vidíme fyziologický stav pri ktorom sa z GlcCer odštiepením cukorného zbytku uvoľňuje Cer. Vpravo je znázornené ako zvýšená aktivita GlukoCeramid deacylázy znižuje hladiny prekursorov Cer metabolizáciou na psychozín a tým ovplyvňuje zloženie epidermálnych Cer.

3.1 Výsledky a diskusia - Syntéza

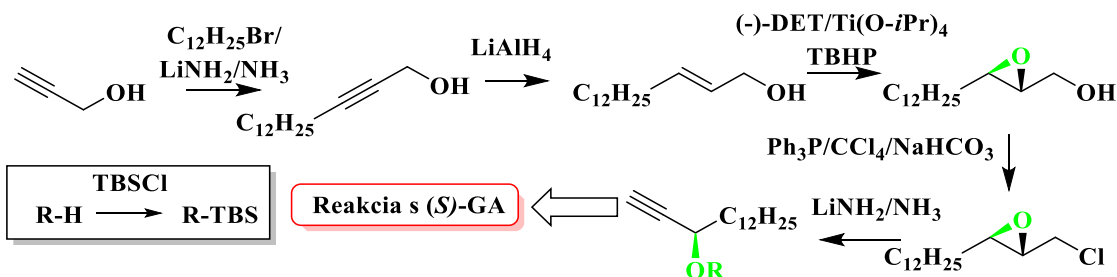
Ku dnešnému dňu bolo publikovaných 6 syntéz H-Cer. Tieto syntézy môžeme rozdeliť do dvoch skupín. Prvú skupinu tvoria syntézy, ktoré k tvorbe polárnej hlavy H-Cer využívajú alkynyláciu (*S*)-Garnerovho aldehydu ((*S*)-*tert*-butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát, (*S*)-GA). Do tejto skupiny spadá 4 zo 6-tich publikovaných syntéz a táto stratégia bola využitá aj v prípade tejto práce. Prehľad a popis syntéz, ktoré využívajú alkynyláciu (*S*)-GA je v tabuľke 2.

Druhú skupinu predstavujú dve syntézy, ktoré už využívali kompletne odlišný prístup. Konkrétne sa jednalo o prístup využívajúci syn-selektívnu Borono-Mannichovu reakciu aziridinových aldehydov⁶⁶ a syntézu založenú na cross-metatéze za použitia Grubbsovho katalyzátoru.⁶⁷

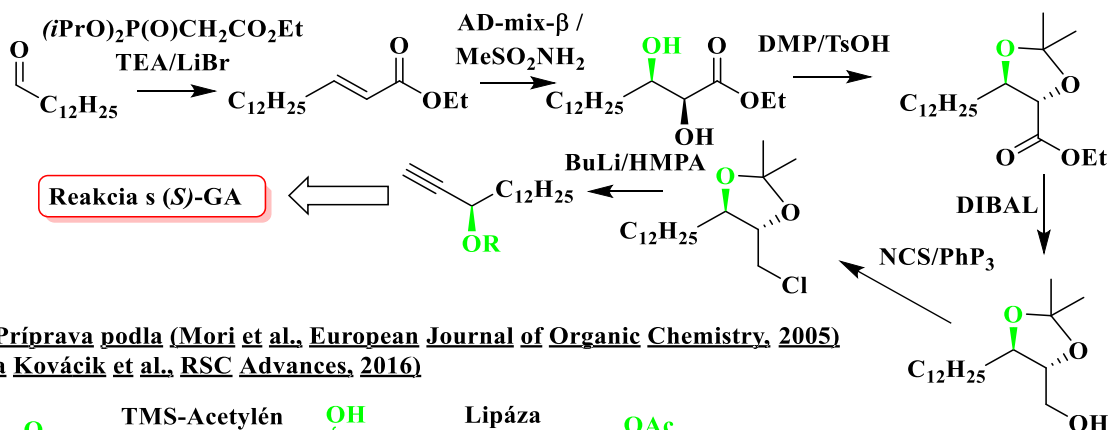
Autor, Ref.	Počet reakcií	Celkový výťažok	Popis syntéz (<i>R</i>)-alkynolu vid' schéma 2
(Yadav et al., Tetrahedron Letters, 2003) ⁶⁸	10	14,7 % (syntéza H)	Kľúčový princíp tejto syntézy spočíval v asymetrickej Sharplesovej epoxidácii nasledovanej reakciou s amidom lítnym za vzniku alkynolu, ktorý vstupoval do reakcie s (<i>S</i>)-GA.
(Chun et al., Journal of Organic Chemistry, 2003) ⁶⁹	10	25,0 % (syntéza H)	Tridekanál bol pomocou Horner-Wadsworth-Emmonsovej reakcie prevedený na α,β -nenасыtený ester, ktorý bol následne asymetricky dihydroxylovaný použitím Sharplesovho katalyzátoru. V ďalších 4-roch krokoch bol pripravený alkynol, ktorý vstupoval do reakcie s (<i>S</i>)-GA.
(Mori et al., European Journal of Organic Chemistry, 2005) ⁵⁹	10	5,0 % (syntéza Cer NH)	Princíp tejto syntézy spočíval v reakcii tridekanálu s TMS-acetylénom. Pro získanie (<i>6R</i>) konfigurácie bola využitá stereoselektívna reakcia vinylacetátu s alkynolom za katalýzy lipázou PS (Amano). Po ochránení bol získaný (<i>R</i>)-alkynol, ktorý vstupoval do reakcie s (<i>S</i>)-GA.
Kováčik et al., RSC Advances, 2016) ⁷⁰	9	0,072 % (syntéza Cer NH)	Táto syntéza využívala obdobný prístup so získaním (<i>R</i>)-alkynolu ako predchádzajúca, teda oddelenie enantiomérov pomocou lipázy.

Tabuľka 2 Prehľad syntéz využívajúcich stratégiu alkynylácie (*S*)-GA

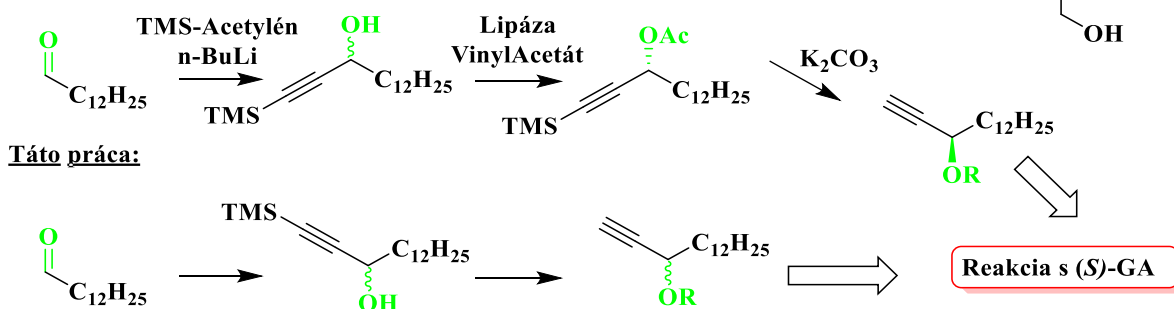
Príprava podla (Yadav et al., Tetrahedron Letters, 2003)



Príprava podla (Chun et al., Journal of Organic Chemistry, 2003)



Príprava podla (Mori et al., European Journal of Organic Chemistry, 2005) a Kováčik et al., RSC Advances, 2016)



Táto práca:

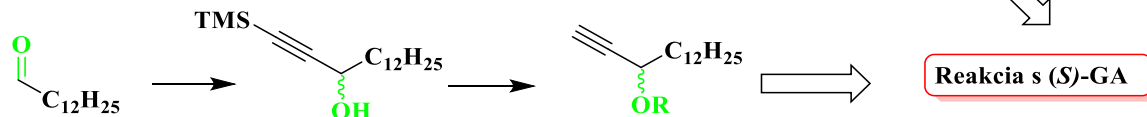


Schéma 2 Popis publikovaných syntéz po reakciu alkylnolu s (S)-GA a porovnanie so stratégiou použitou v tejto práci.

Spoločným menovateľom týchto syntéz bola reakcia (R)-alkynolu s (S)-GA, ktorá nás privádza k stratégii využitej v tejto práci.

Stratégia pre novú syntetickú cestu, použitú v tejto práci, spočívala v obídení lipázovej reakcie a teda na reakcii racemického (R/S)-alkynolu s (S)-GA a následnou izoláciou požadovaného diastereoméru pomocou stĺpcovej chromatografie (viď schéma 3).

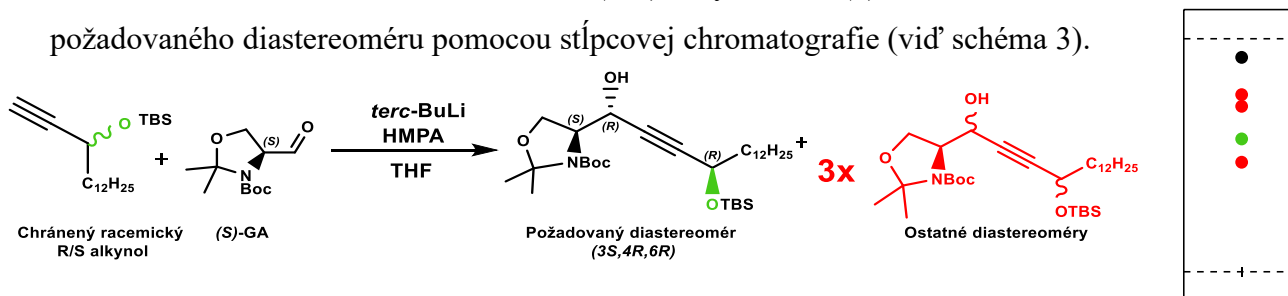


Schéma 3 Stratégia syntézy použitá v tejto v práci. Vpravo môžeme vidieť Rf všetkých 4 diastereomérov, pričom žiadaný Rf je vyznačený zelenou farbou.

3.1.1 Schéma syntézy

Cieľom tejto práce bolo pripraviť H a H-Cer. Celá syntéza pozostávala z dvoch častí: 1.) Syntéza H a 2.) acylačné reakcie za vzniku H-Cer. Celkový prehľad syntézy aj s číselným označením jednotlivých produktov môžeme vidieť na schéme 4.

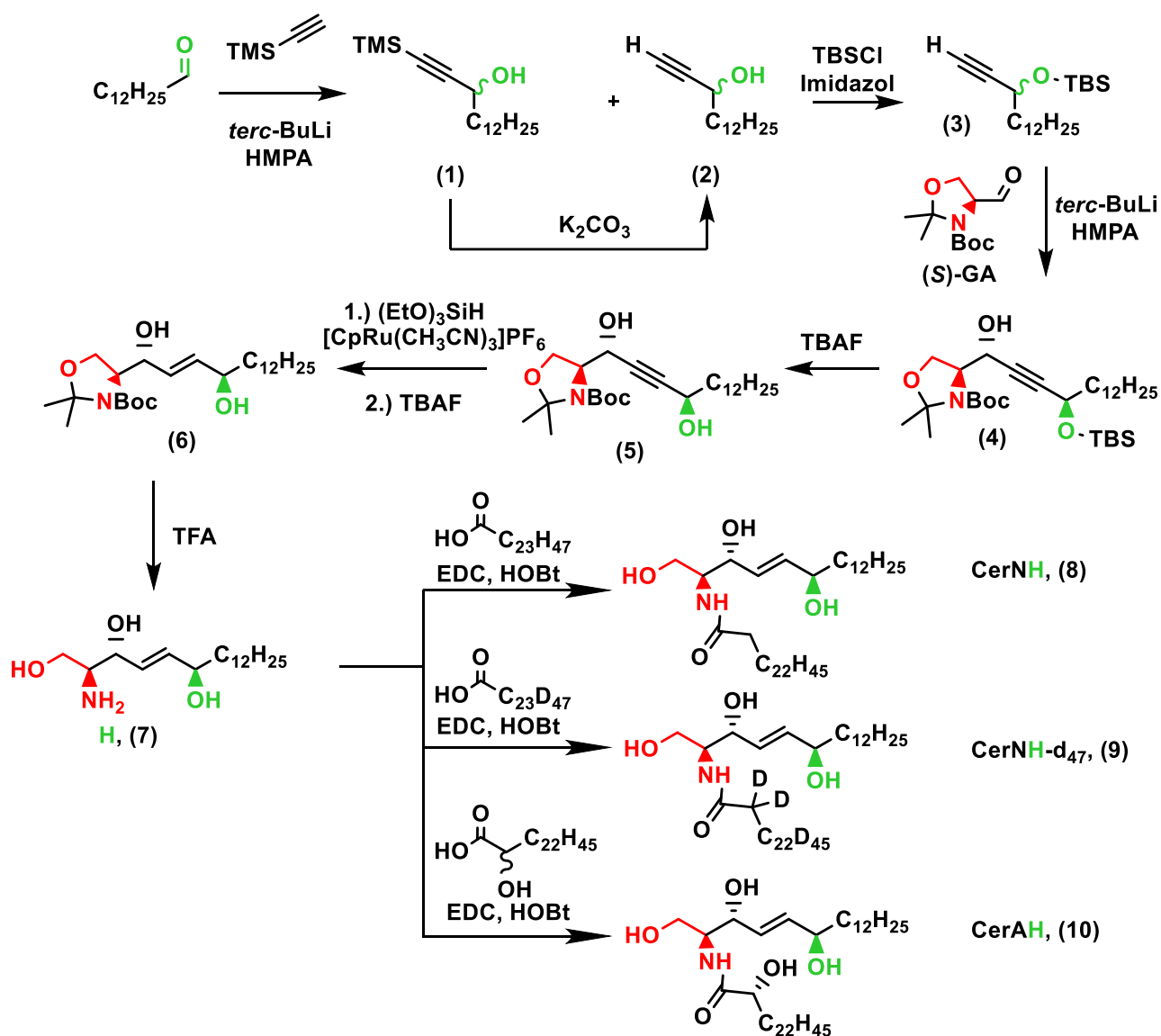


Schéma 4 Prehľad syntézy H-Cer použitej v tejto práci. Pri štruktúrach v zátvorke je číselné označenie jednotlivých produktov.

3.1.2 Syntéza 6-hydroxysfingozínu

Syntéza **H** vychádzala z reakcie komerčne dostupného tridekanálu s TMS-acetylénom v prostredí *n*-BuLi za bezvodých podmienok pri $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Táto reakcia neposkytovala požadovaný výťažok a tak bola optimalizovaná. Optimalizácia spočívala vo zvýšení bázicity reakčnej zmesi obmenou *n*-BuLi za reaktívnejší *tert*-BuLi a prídavkom silnej Lewisovej bázy HMPA (hexametylfosforamid). Prídavok HMPA mal za účinok tvorbu tzv. SIPs, z anglického Solvent-separated ion pairs, teda monomérnych jednotiek nukleofilov s vysokou energiou a reaktivitou.⁷¹ Tvorbu týchto jednotiek môžeme vidieť na schéme 5.

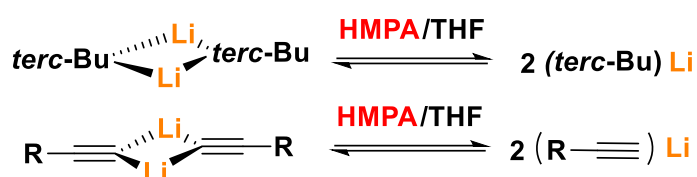


Schéma 5 Vplyv HMPA na tvorbu SIP

Optimalizáciou sa podarilo zvýšiť výťažok (*R,S*)-1-(trimethylsilyl)pentadec-1-yn-3-olu (**1**) z pôvodných 55 % na 87 %. Okrem toho bol z reakčnej zmesi izolovaný aj (*R,S*)-Pentadec-1-yn-3-ol (**2**) s výťažkom 12 % čo bolo pravdepodobne spôsobené zvýšenou nukleofilitou reakčnej zmesi. Tento druhý produkt bol štruktúrne identický s produktom nasledujúcej reakcie, preto bol neskôr taktiež použitý. Sčítanie oboch výťažkov poukazuje na takmer kvantitatívny priebeh reakcie.

V ďalšom kroku bol ochránený kyslý vodík acetylénovej skupiny u oboch enantiomérov spoločne, pomocou reakcie s uhličitanom draselným v methanole. Táto reakcia prebiehala takmer kvantitatívne za laboratórnej teploty.

Keďže voľná hydroxylová skupina by reagovala za použitia silnej báze pri alkynylácii (*S*)-GA musela byť ochránená. Pre ochránenie bola využitá reakcia s *tert*-butyldimethylsilylchloridom v prostredí imidazolu ako báze pre vychytávanie vznikajúceho kyslého protónu. Táto reakcia taktiež prebiehala takmer kvantitatívne za vzniku (*R,S*)-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)pentadec-1-ynu (**3**). Prehľad komentovaných reakcií vidíme na schéme 6.

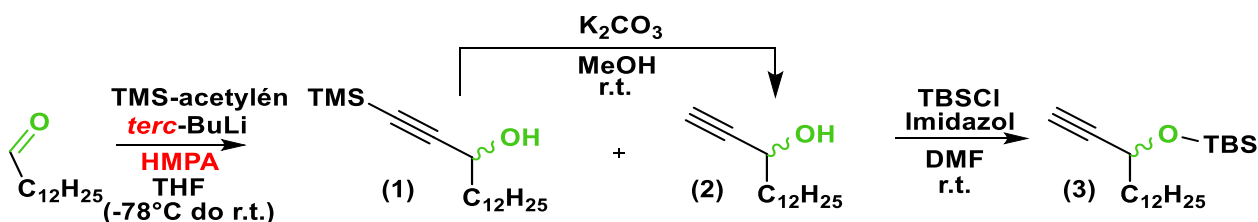


Schéma 6 Prvá časť syntézy **H**

Nasledovala hlavná reakcia tejto syntézy a to alkynylácia (*S*)-GA. Pre túto reakciu bola použitá racemická zmes (*R,S*)-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)pentadec-1-ynu (**3**), ktorá reagovala s (*S*)-GA za prítomnosti silnej bázy (*n*-BuLi, *tert*-BuLi). Všetky reakcie boli realizované za bezvodých podmienok pri nízkych teplotách (-78 °C, -40 °C) v bezvodom THF. Okrem silnej bázy bol do reakcií pridávaný aj HMPA. Ten mal v reakčnej zmesi podporovať vznik *anti*-produktu nukleofilnej adície, teda (*3S,4R,6R*). Vzniknuté 4 diastereoméry boli oddelené pomocou stĺpcovej chromatografie. Túto reakciu je možné popísať dvoma rôznymi mechanizmami.

Pre pochopenie rôznych produktov je potrebné priblížiť dva teoretické modely mechanizmov nukleofilnej adície na (*S*)-GA, a to **Cram-Chelatačný model** a **polárny Felkihn-Ahnov model**.

Cram chelatačný model

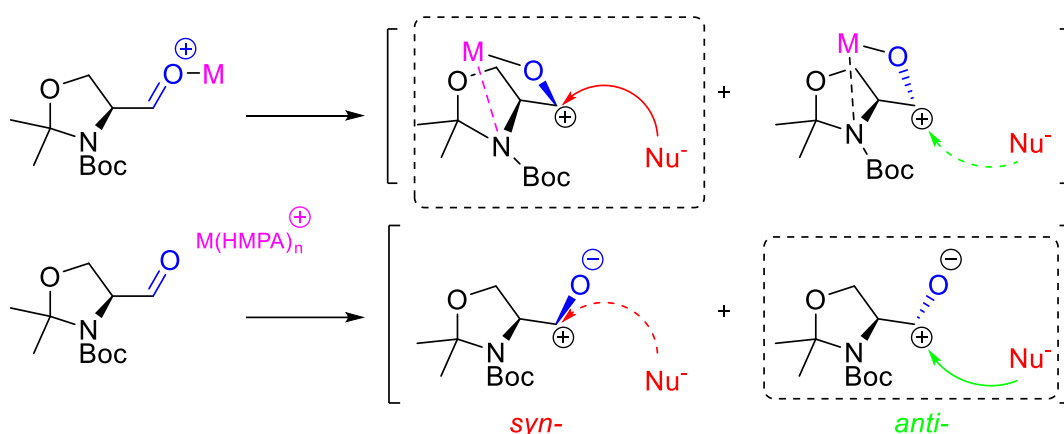


Schéma 7 Nukleofilná adícia (*S*)-GA podľa Cram-Chelatačného modelu, M značí polyvalentný ión.

Tento model popisuje, že v prítomnosti polyvalentných iónov je stabilizovaný intermediát (tzv. Cram-chelatačný komplex) v ktorom je kyslík karbonylovej skupiny natočený smerom k substituentu s najväčším dipólovým momentom. Nukleofil potom pristupuje zo sterickej najviac prístupnej strany.⁷² HMPA by vtom prípade mal za úlohu vychytávať ióny, ktoré by stabilizovali takýto komplex. Tento model by nevysvetľoval výsledky experimentu bez prítomnosti HMPA, kde majoritne vznikal *anti*-produkt. Popis nukleofilnej adície podľa Cram-chelatačného modelu vidíme na schéme 7.

Polárny Felkihn-Ahnov model

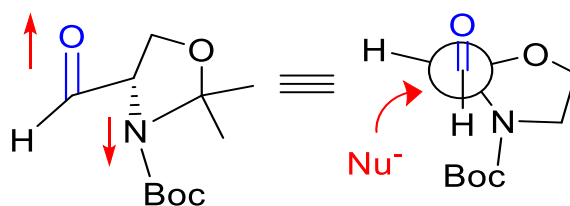


Schéma 8 Nukleofilná adícia (*S*)-GA podľa polárneho Felkihn-Ahnoveho modelu, červené šípky poukazujú na opačný polaritný vektor substituentov.

Upravený (polárny) Felkihn-Ahnov model popisuje usporiadanie substituentov pri nukleofilnej adícii tak, že substituent s najväčším polaritným vektorom sa orientuje opačne od sp^2 hybridizovaného uhlíka karbonylovej skupiny. Nukleofil potom pristupuje so stéricky najviac prístupnej strany za tvorby *anti*-produktu reakcie.⁷³ Tento model lepšie vysvetľuje experimentálne získané výsledky. HMPA v tomto prípade spĺňa funkciu zvyšovania nukleofilyty tvorbou už spomínaných SIPs a teda preferenciou ku kinetickému produktu reakcie.⁷¹ Popis nukleofilnej adície podľa polárneho Felkihn-Ahnoveho modelu vidíme na schéme 8.

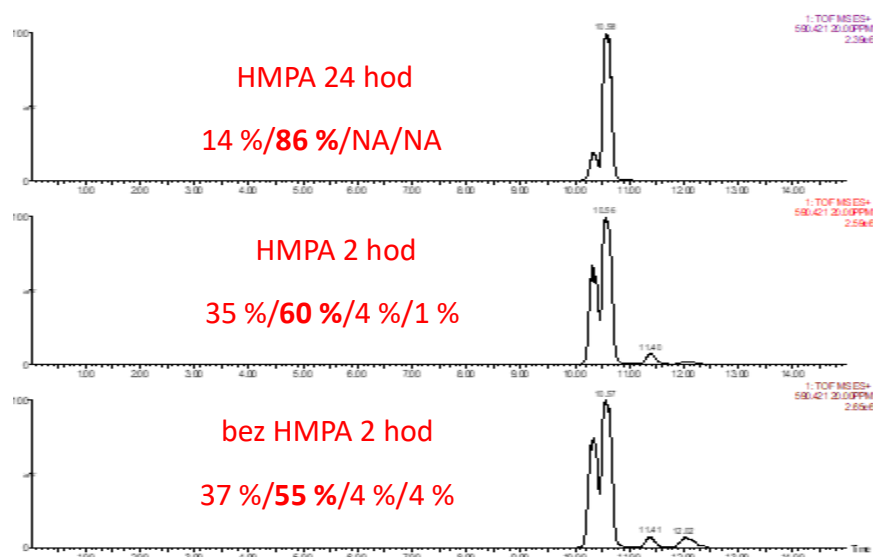
Tato reakcia bola postupne optimalizovaná. Postup c.) bol prvý postup za použitia *n*-BuLi a 2 ekv. HMPA. Reakcia poskytla výťažok 40 %. Následne bola reakcia optimalizovaná pomocou zámény *n*-BuLi za reaktívnejšie *tert*-BuLi, vid' Postup a.). Takto sa podarilo zvýšiť výťažok na 74 %. Ďalej bola skúšaná optimalizácia za pomoci zvýšenia teploty z $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri pridávaní roztoku (*S*)-GA, a predĺženia reakčného času z 24 hod na 48 hod, vid' Postup b.). Zrejme z dôvodu rozkladu produktu bol výťažok reakcie znížený na 60 %. Z výsledkov je jasné, že ako najlepší postup pre alkynyláciu (*S*)-GA sa javí Postup a.).

Spoločným rysom všetkých reakcií bol obsah výsledného produktu v zmesi 4 diastereomérov, vždy viac ako 50 %. Keďže do reakčnej zmesi vstupovala racemická zmes tento výsledok sa javil ako veľmi nepravdepodobný. Bola teda overená špecifická optická otáčanivosť izolovaného diastereoméru. Namerané hodnoty odpovedali referenčnej literatúre (vid' Experimentálna časť - syntéza).

$$[\alpha]_D^{20} = -4,678, \text{Ref. } [\alpha]_D^{20} = -4,6; \text{Kováčik et. al., Ref. } [\alpha]_D^{20} = -4,3; \text{Mori et. al.}$$

Aj ďalšie spektrálne metódy potvrdili štruktúru vzniknutého diastereoméru. Taktiež špecifická optická otáčanivosť alkynolu potvrdila, že do reakcie vstupovala racemická zmes (e.e.(3) = 2%).

Priebeh tejto reakcie sme ďalej študovali pomocou LC/MS experimentu, v ktorom sme sledovali vplyv prídavku HMPA na výsledný relatívny obsah jednotlivých diastereomérov. Príprava jednotlivých reakčných zmesí a podmienky merania sú popísané v Experimentálnej časti. Výsledné chromatogramy vidíme na obrázku 18.



Obrázok 18 Chromatogramy z LC/MS experimentov alkynylácie (S)-GA

Tento experiment ukázal, že už v druhej hodine bol viditeľný vplyv prídavku HMPA na relatívny obsah diastereomérov, 60 % (s prídavkom HMPA) k 55 % (bez prídavku HMPA). Ešte zaujímavejší je výsledok po 24 hod kde môžeme vidieť, že relatívny obsah žiadaneho diastereoméru je až 86 % a dva diastereoméry už nie sú detekovateľné.

Je veľmi podstatné zdôrazniť, že dáta z tohto experimentu sú nanajvyš orientačné hneď z niekoľkých dôvodov:

- 1) Pre kvantifikáciu bola použitá metóda normalizácie bez prídavku vnútorného štandardu. To znamená, že nie je možné vylúčiť vplyv rozkladu látok na relatívny obsah diastereomérov. Teda výsledných 86 % obsahu žiadaneho diastereoméru mohlo byť spôsobených najvyššou stabilitou molekuly, pričom ostatné diastereoméry boli postupne rozložené.
- 2.) Experiment nebol opakovaný
- 3.) Chýbajú nám údaje o kontrolnej reakčnej zmesi (zmes bez prídavku HMPA) po 24 hod

Aj napriek týmto výhradám, výsledky poukazujú nato, že táto reakcia ešte nie je úplne pochopená a bude predmetom ďalšieho štúdia. Keďže hlavným cieľom tejto práce bola totálna syntéza a štúdium H-Cer bol izolovaný produkt použitý do ďalších reakcií.

V ďalšom kroku nasledovalo ochránenie vzniknutého (4) pomocou fluoridových iónov (TBAF) v bezvodom THF. Reakcia taktiež prebiehala takmer kvantitatívne. Popis reakcií komentovaných vyššie vidíme na schéme 9.

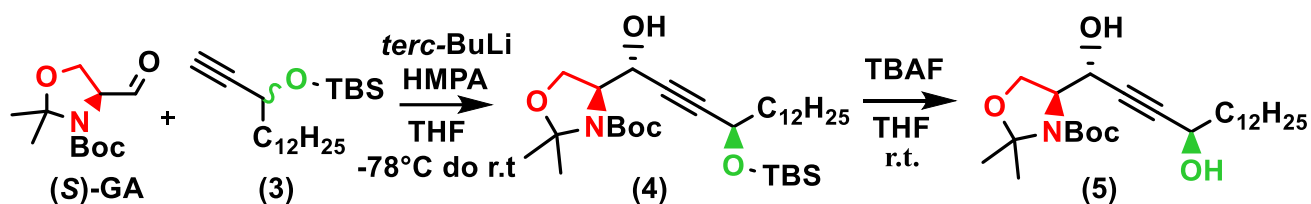


Schéma 9 Popis druhej časti syntézy H, vrátane alkynylácie (S)-GA

Ďalším krokom v syntéze bola redukcia trojitej väzby za pomoci *trans*-selektívnej Trostovej hydrosilylácie s následnou protodesilyláciou.^{74,75} Táto reakcia pozostávala z dvoch krokov. V prvom sa jednalo o adíciu triethoxysilánu na trojitú väzbu za katalýzy $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]\text{PF}_6$ v bezvodom acetóne pri 0 °C. V druhom kroku bola triethoxysilylová skupina odštiepená pomocou fluoridových iónov (TBAF) v bezvodom THF. Medziprodukt reakcie, teda produkt adície triethoxysilánu, sa aj napriek snahám nepodarilo izolovať. Reakcia je znázornená na schéme 10.

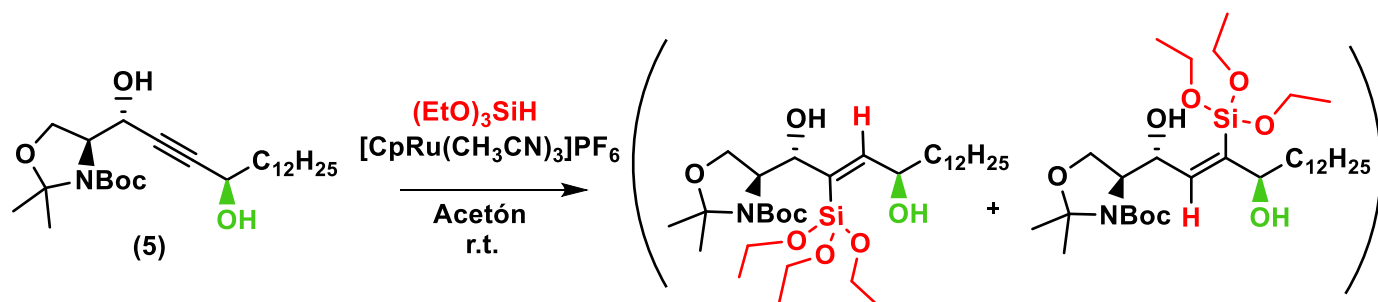


Schéma 10 Neúspešný pokus o izoláciu produktu Trostovej Hydrosilylácie.

Reakcia bola úspešná len ako dvojkroková bez izolácie medziproduktu. Reakcia je znázornená na schéme 11.

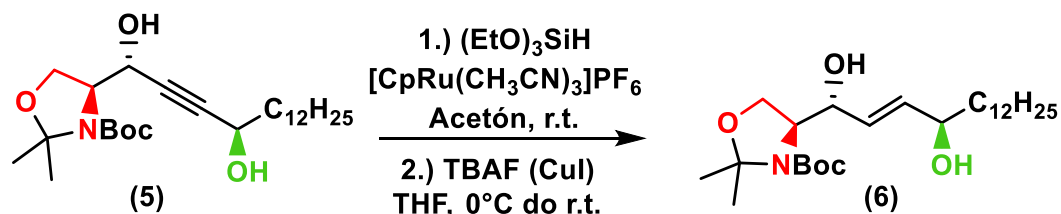


Schéma 11 Popis *trans*-selektívnej redukcie trojitej väzby

Táto reakcia bola taktiež mnohonásobne optimalizovaná. V jednom postupe bolo po prvom kroku reakcie odparené rozpúšťadlo. V druhom postupe boli do reakčnej zmesi pridávané reagenty bez ďalšej manipulácie (viď Experimentálna časť – syntéza). Optimalizované bolo množstvo reaktantov a postup. Aj napriek snahám sa nám nepodarilo získať žiadnu koreláciu medzi optimalizovaným parametrom a výťažkom reakcie. Výsledky tejto optimalizácie môžeme vidieť v tabuľke 3.

Teplota*	Postup	Reakčný čas	(EtO) ₃ SiH (ekv.)	CuI	Výťažok
0 °C	b.)	24 hod	2,5	Nie	26 %
40 °C	b.)	24 hod	3,0	Áno	30 %
40 °C	b.)	48 hod	3,0	Áno	21 %
0 °C-r.t	a.)	24 hod	2,5	Áno	25 %
0 °C-r.t	a.)	24 hod	3,0	Áno	76 %

Tabuľka 3 Výsledky optimalizácie trans-selektívnej redukcie trojitej väzby. *Teplota pri Trostovej hydrosilylácii. Pridávanie roztoku TBAF vždy prebiehalo za zníženej teploty (0 °C) z dôvodu veľmi prudkej reakcie.

K výťažku 76 % je nutné dodať, že sa nám takýto výsledok nepodarilo opakovať. Táto reakcia je veľmi citlivá na čistotu použitých reaktantov a rozpúšťadiel. Významnou bola aj optimalizácia metódy čistenia kde mobilná fáza Hexán/EtOAc 1/1 výrazne urýchlila separáciu a zvýšila čistotu produktov.

Posledným krokom v syntéze **H** bolo ochránenie polárnej hlavy *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*,2*E*)-1,4-dihydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (**6**) za pomoci silnej kyseliny. Reakcia prebiehala vo vodnom roztoku trifluoroctovej kyseliny (TFA/H₂O, 3,75/1). Keďže východzia látka nebola rozpustná v danom roztoku TFA, reakcia prebiehala v suspenzii. To značne komplikovalo manipuláciu a spracovanie reakčnej zmesi. Reakciu sme teda optimalizovali prídavkom dichlórmetánu (DCM), čím sa nám podarilo látku v reakčnej zmesi rozpustiť. Po dokončení reakcie (približne 3 hod) bola reakcia alkalizovaná do pH=9 pomocou nasýteného vodného roztoku NH₃. Podstatným krokom bolo aj čistenie takto vzniknutého **H**. Keďže sa jedná o lipofilný primárny amín, čistenie na kyslom silikagéle bolo náročné z dôvodu vysokej retencie **H** na stĺpci. To bolo vyriešené prídavkom diethylamínu (DEA) do mobilnej fázy. Taktiež prídavok 2-propanolu (*i*-PrOH) podporoval priebeh separácie počas stĺpcovej chromatografie. Výsledná mobilná zmes pre čistenie **H** bola CHCl₃/*i*-PrOH/MeOH/DEA 40/30/20/0,1.

Výtťažok tejto poslednej reakcie bol 74 % a celkovej syntézy **fyziológického H** 40 %. V porovnaní s celkovými výtťažkami a počtom reakcií publikovaných syntéz (Yadav et al., 15 % a 10 reakcií⁶⁸; Chun et al., 25 % a 10 reakcií⁶⁹; Wisse et al., 16 % a 9 reakcií⁶⁷) predstavuje táto nová 7-kroková syntetická cesta jednoduchšiu, kratšiu a efektívnejšiu alternatívu pre prípravu fyziológického H. Takto pripravený čistý H bol využitý v následných biochemických a biofyzikálnych štúdiách a taktiež do acylačných reakcií pre prípravu 6-hydroxyceramidov.

3.1.3 Syntéza 6-hydroxyceramidov

Syntéza **CerNH** a **CerNH-d₄₇** (Cer NH s deuterovanou masťou kyselinou) prebiehala reakciou H s lignocerovou kyselinou (LIG/*d*-LIG) s prídavkom 1-hydroxybenzotriazolu (HOBt) a *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu (EDC) v prostredí suchého THF pri zníženej teplote. Prídavok HOBt a EDC bol potrebný pre zvýšenie selektivity tvorby amidu oproti esteru. Reakcia v prostredí THF prebiehala v suspenzii čo bolo vyriešené prídavkom DCM. Výtťažok týchto acylačných reakcií bol 90 % (CerNH) a 95 % (CerNH-d₄₇). Taktiež pri porovnaní celkového výtťažku a počtu reakcií prezentovanej syntézy CerNH (36 %, 8 reakcií) s publikovanou syntézou (Mori et al., 5 % a 10 reakcií⁵⁹) sa táto nová syntetická cesta javí ako výhodná alternatíva.

Okrem toho bola skúšaná priama dvojkroková cesta z *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*,*E*)-1,4-dihydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidín-3-karboxylátu (**6**) kde v prvom kroku bola ochránená polárna hlava obdobne ako pri syntéze H. Táto surová reakčná zmes však nebola čistená a bola použitá do acylačnej reakcie s LIG za rovnakých podmienok ako bolo popísané vyššie. Produkt sa však z dôvodu komplikovaného čistenia nepodarilo izolovať v dostatočnom množstve a tento prístup sa ukázal ako nevhodný.

Syntéza **CerAH** prebiehala obdobne ako syntéza CerNH acylačnou reakciou **H** a cerebrónovej kyseliny (**CA**, 2-hydroxylignocerová kyselina) za prítomnosti HOBt a EDC v zmesi THF/DCM. Keďže do reakcie vstupovala racemická CA, pripravená v rámci iného projektu, reakčná zmes obsahovala viacero produktov. Celkovo sme izolovali tri látky z ktorých jedna bola identifikovaná ako CerNH (neoddelený podiel LIG v CA) a ďalšie dve látky identifikované ako dva neznáme diastereoméry CerAH. Celkový výtťažok reakcie k majoritnému diastereoméru CerAH bol 47 %.

Prehľad popisovaných reakcií vidíme na schéme 12.

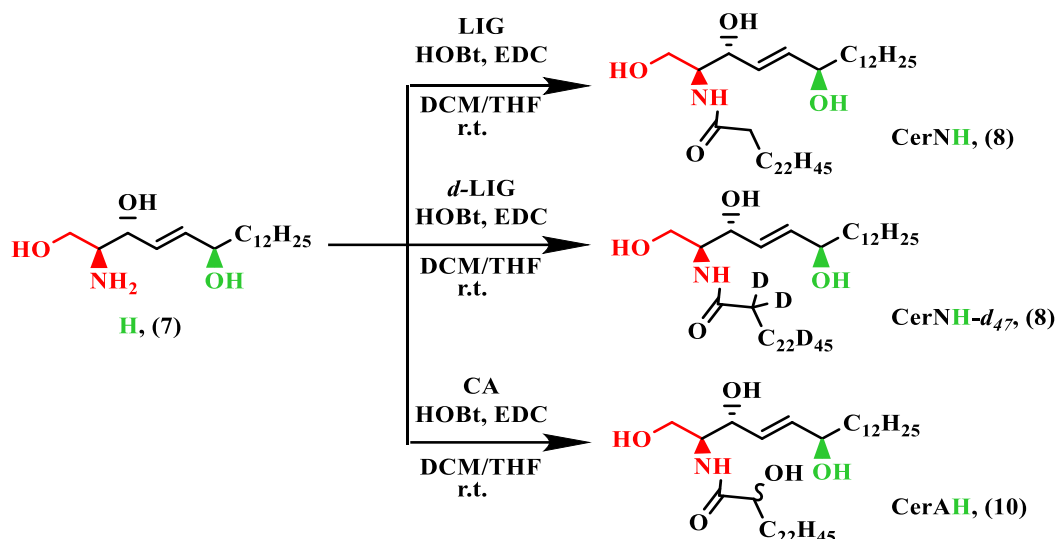


Schéma 12 Prehľad príprav troch H-Cer z H, konkrétne CerNH, CerNH-d₄₇ a CerAH.

3.1.4 Syntéza (*R*)-Cerebrónovej kyseliny

Z dôvodu, obtiažnej identifikácie absolútnej konfigurácie diastereoméru CerAH z predošlej reakcie sme pokračovali v diastereoselektívnej syntéze fyziologického CerAH. Stratégia bola obdobná ako pri syntéze H a teda vytvorenie dvoch diastereomérov CA, ktoré by sme od seba separovali pomocou stĺpcovej chromatografie. Vytvoriť diastereoméry sme sa pokúšali naviazaním chránenej chirálnej čistej aminokyseliny (*N*-Acetyl-*L*-Alanín, *N*-Ac-Ala) na C2-hydroxylovú skupinu CA. Všetky reakcie prebiehali obdobným spôsobom - najprv vytvorením chloridu chránenej aminokyseliny a následným pridaním roztoku CA. Všetky reakcie prebiehali za katalýzy DMF (dimethylformamid). Žiaľ, v žiadnej zo skúšaných reakcií sa nám nepodarilo izolovať výsledný produkt. Prehľad týchto reakcií môžeme vidieť na schéme

13.

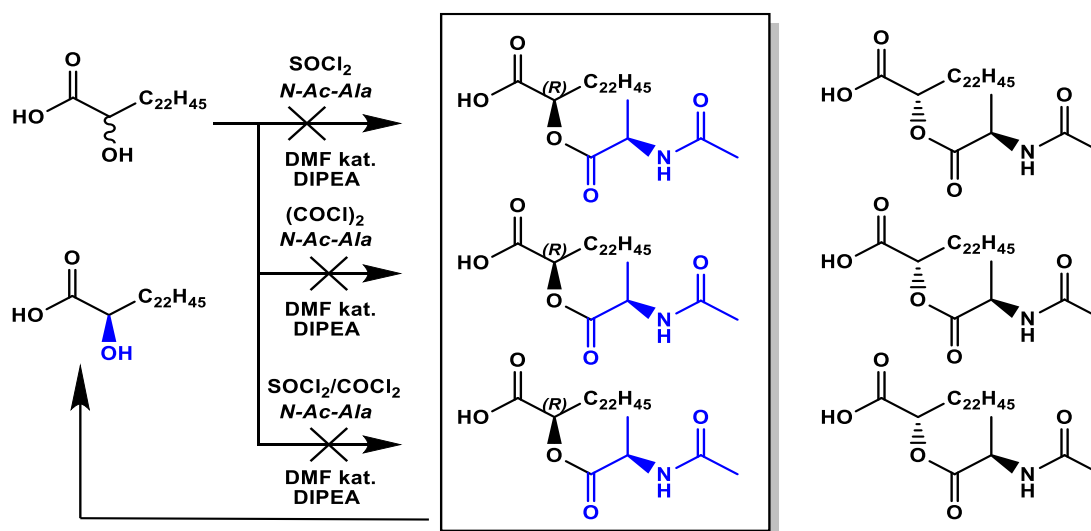
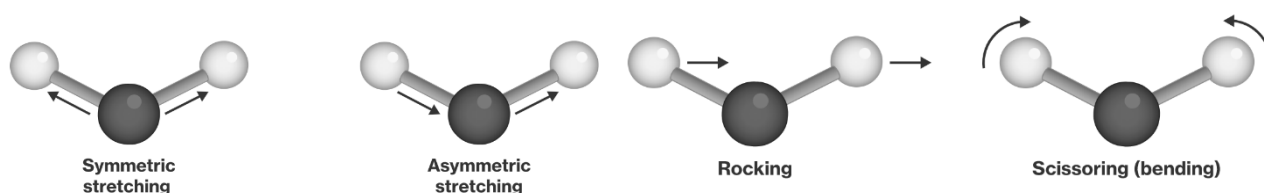


Schéma 13 Prehľad reakcií pri pokuse o stereoselektívnu syntézu (*R*)-CA

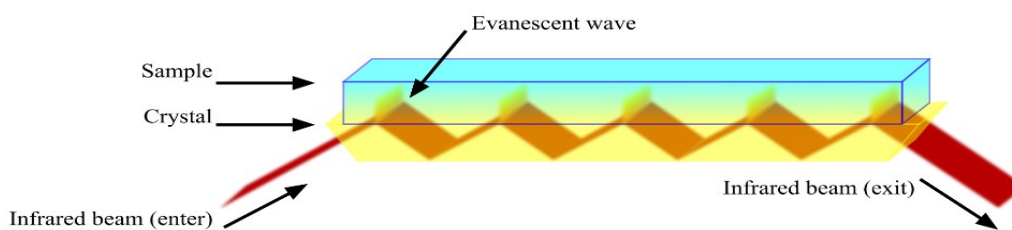
3.2 Výsledky a diskusia - Hodnotenie lipidových membrán s CerNH

Pre popis funkcie CerNH boli pripravené dva typy modelových lipidových membrán v zložení CerNH/LIG/Chol/CholS (**membrána A**) a CerNH/*d*-LIG/Chol/CholS (**membrána B**), ktoré mali za úlohu vytvoriť zjednodušený model SC. Pre štúdium ich mikroštruktúry bola použitá infračervená spektroskopia (IR). Táto metóda využíva absorpcie elektromagnetického žiarenia, konkrétne infračerveného svetla, molekulami. Absorpcia vyvoláva zmeny v ich vibračne-rotačných stavoch na základe zmeny ich dipólového momentu. Výstupom takýchto meraní je graficky vyjadrená závislosť **absorbancie** (bezrozmerná veličina), prípadne **transmitancie** ($T=[\%]$) na **vlnočte** (prevrátená hodnota vlnovej dĺžky, cm^{-1}). Poznáme dve základné skupiny vibračne-rotačných stavov a to **valenčné vibrácie** (zmena dĺžky väzieb) a **deformačné vibrácie** (zmena väzbového uhlu).⁷⁶ Základné štyri typy vibrácií môžeme vidieť na obrázku 19.



Obrázok 19 Popis 4 základných typov vibrácií, prebrané z coursehero.com/sg/organic-chemistry/infrared-ir-spectroscopy/

V tejto práci bola použitá infračervená spektroskopia **zoslabeného úplného odrazu** (z anglického, attenuated total reflectance, **ATR**) s následnou aplikáciou **Fourierovej transformácie** (matematická metóda umožňujúca transformáciu spektier z časovej do frekvenčnej domény, **FT**). Odtiaľ skratka **ATR-FTIR**. Pri tomto type merania lúč IR svetla dopadá pod určitým uhlom do špeciálne upraveného hranolu (napr. kryštálu germánia), kde je plne reflektovaný. Pri tomto odraze vzniká tzv. evanescentná vlna (typ elektromagnetickej vlny), ktorá presahuje tento kryštál až do skúmaného vzorku. Absorpcia tejto vlny je detekovaná a ďalej vyhodnocovaná. Princíp tejto metódy môžeme vidieť na obrázku 20.



Obrázok 20 Na obrázku môžeme vidieť princíp ATR IR spektroskopie. Vľavo dole môžeme vidieť vstup infračerveného lúču do kryštálu a tvorbu evanescentnej vlny a v modrom obdĺžniku priestor kde je uložená vzorka lipidovej membrány. Prevzaté z en.wikipedia.org/wiki/Attenuated_total_reflectance

3.2.1 Izotopová substitúcia

Pre detailnejší popis mikroštruktúry bola využitá tzv. Izotopová substitúcia. Táto metóda spočíva v substitúcií atómov vodíka atómami ťažších izotopov v študovanej zmesi. V tejto práci bola používaná substitúcia ^1H za ^2H (deutérium) a to substitúciou LIG za *d*-LIG. Príprava týchto membrán je popísaná v kapitole Experimentálna časť - Modelové lipidové membrány.

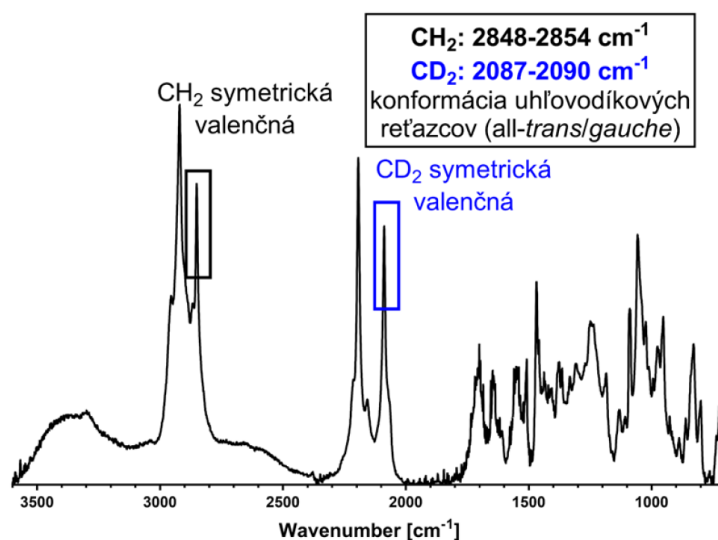
Výhodou tejto metódy je možnosť štúdia správania jednotlivých reťazcov bez narušenia samotnej mikroštruktúry. To je spôsobené rozdielnymi hodnotami vlnočtov pri ktorých vibrujú protónované a deuterované reťazce.

V tejto práci boli študované dve konkrétne vibrácie a to **valenčná symetrická vibrácia** a **deformačná nožnicová vibrácia**.

Význam a výsledky jednotlivých vibrácií budú komentované nižšie.

3.2.2 Valenčná symetrická vibrácia

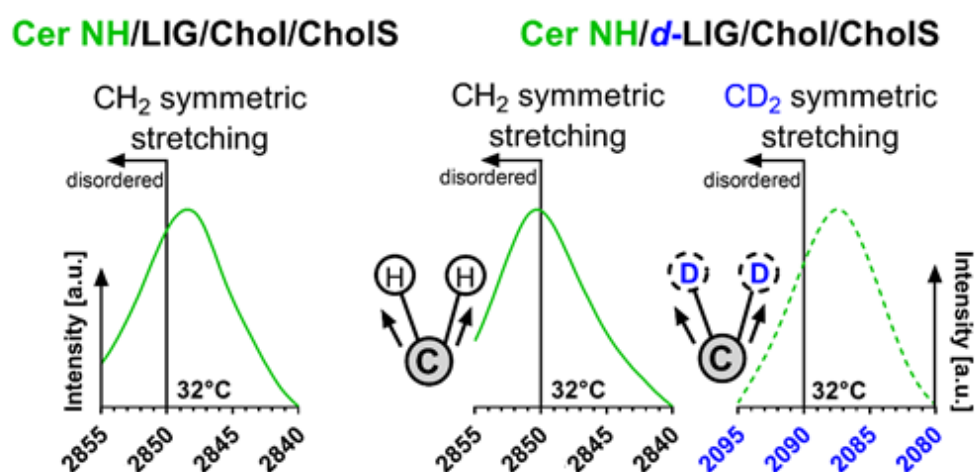
Táto valenčná symetrická vibrácia CH_2 alebo CD_2 vypovedá o usporiadaní nasýtených reťazcov v modelovej membráne. Jej typické hodnoty maxim absorbancie sú v rozmedzí $2848\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ pre protónované reťazce a $2088\text{-}2092\text{ cm}^{-1}$ pre deuterované reťazce. Typické IR spektrum modelovej lipidovej membrány a taktiež polohy symetrických valenčných vibrácií môžeme vidieť na obrázku 21.



Obrázok 21 IR spektrum modelovej lipidovej membrány. Zvýraznené sú študované symetrické valenčné vibrácie protónovaných aj deuterovaných reťazcov.

S narastajúcim vlnočtom klesá usporiadanosť týchto reťazcov. Teda ak majú CH_2 svoje maximum pod hodnotou 2850 cm^{-1} (2090 cm^{-1} pre CD_2 vibrácie) môžeme tvrdiť, že väčšina reťazcov je veľmi dobre usporiadaná, teda v all-trans konformácií. Naopak prekročenie týchto hraničných hodnôt vypovedá o vyššom obsahu gauche konformérov a horšej organizácii reťazcov v membráne.⁷⁷

Na obrázku 22 môžeme vidieť výsledky meraní valenčných symetrických vibrácií modelových lipidových membrán s CerNH.

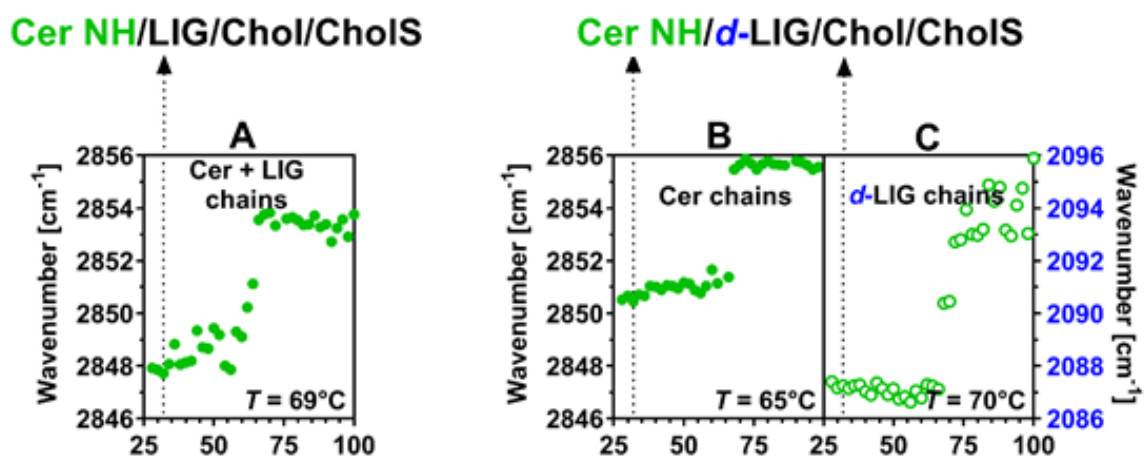


Obrázok 22 Výsledky meraní symetrickej valenčnej vibrácie pri fyziologickej teplote ľudskej kože. Vľavo membrána A, Vpravo membrána B.

V membráne A vidíme, že pri fyziologickej teplote ľudskej kože ($32\text{ }^{\circ}\text{C}$) sa maximum valenčnej symetrickej vibrácie nachádza pod hodnotou 2850 cm^{-1} . To značí, že väčšina reťazcov sa nachádza v all-trans konformácii a teda, že membrána je celkovo dobre usporiadaná.

V membráne B vidíme polohu maxima protónovaných reťazcov (reťazce Cer) a deuterovaných reťazcov (mastná kyselina) nezávisle od seba. Ako môžeme vidieť protónované reťazce majú pri fyziologickej teplote ľudskej kože ($32\text{ }^{\circ}\text{C}$) svoje maximum nad hodnotou 2850 cm^{-1} . To značí o vyššom obsahu gauche konformérov a nižšom stupni organizácie reťazcov. Naopak deuterované reťazce (tvorené len *d*-LIG) majú hodnotu maxima pod hodnotou 2090 cm^{-1} . To značí o dobrej organizácii reťazcov mastnej kyseliny, teda vysokom obsahu all-trans konformérov. Teda je možné tvrdiť, že v tomto type membrány sú reťazce kyseliny oveľa lepšie usporiadané než reťazce Cer.

V ďalšom kroku boli študované fázové vlastnosti týchto membrán. Modelové membrány boli zahrievané od 28 °C do 100 °C, pričom každé 2 °C bolo zaznamenané IR spektrum. Výsledky týchto tzv. termotropných experimentov môžeme vidieť na obrázku 23.



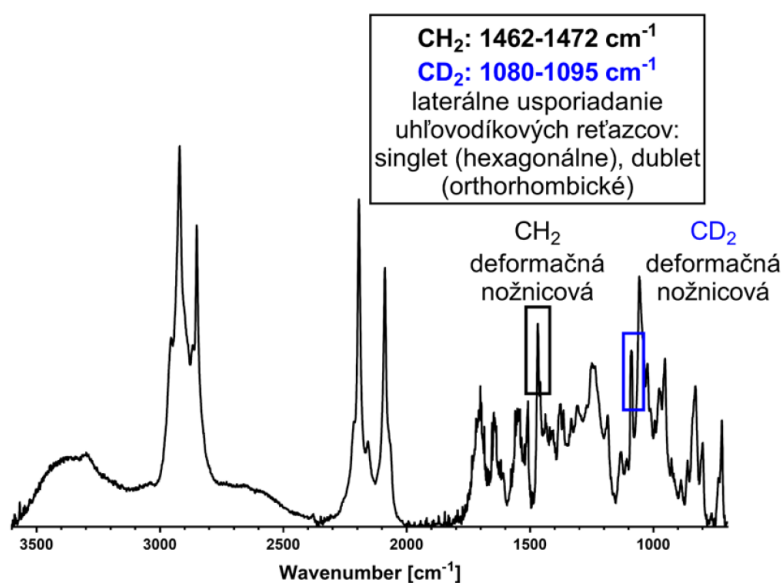
Obrázok 23 Popis termotropnej evolúcie valenčných symetrických membrán. T označuje teplotu fázového prechodu. Vľavo membrána A, Vpravo membrána B.

V membráne A bol nameraný fázový prechod reťazcov 69 °C. Tento prechod značí o teplote pri ktorej reťazce strácajú all-trans konformáciu a masívne pribúda počet menej organizovaných gauche konformérov.

V membráne B znovu vidíme chovanie protónovaných a deuterovaných reťazcov nezávisle od seba. Teplota fázového prechodu protónovaných reťazcov bola 65 °C a deuterovaných 70 °C. Tento rozdiel vo termotropnom chovaní reťazcov ďalej podporuje fakt, že reťazce mastných kyselín v týchto membránach vytvárajú samostatné podjednotky (domény) a teda, že nie sú plne miešateľné s ostatnými lipidmi.

3.2.3 Deformačná nožnicová vibrácia

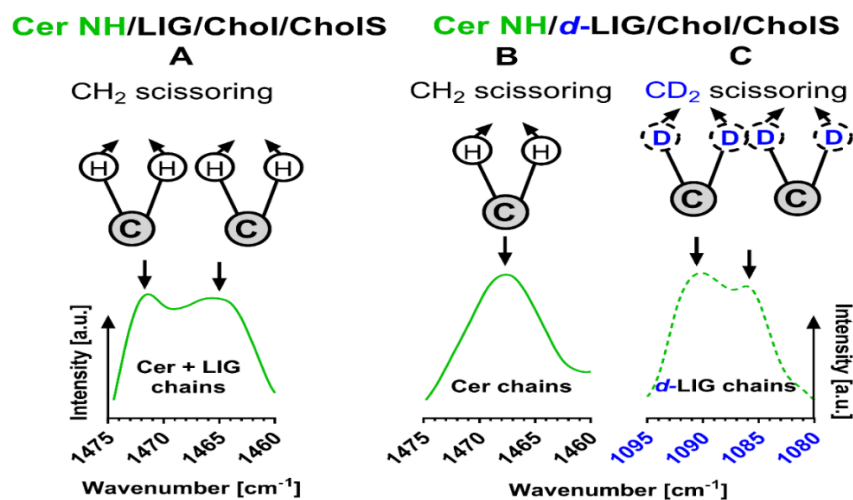
Táto deformačná nožnicová vibrácia nám umožňuje štúdium laterálneho usporiadania a taktiež miešateľnosti lipidov v modelových membránach. Jej typické hodnoty maximálnej absorpcie sú $1462\text{-}1472\text{ cm}^{-1}$ pre protónované reťazce a $1080\text{-}1095\text{ cm}^{-1}$ pre deuterované reťazce. Typické IR spektrum modelovej lipidovej membrány a taktiež polohy deformačných nožnicových vibrácií môžeme vidieť na obrázku 24.



Obrázok 24 IR spektrum modelovej lipidovej membrány. Zvýraznené sú študované deformačné nožnicové vibrácie protónovaných aj deuterovaných reťazcov.

Pri štúdiu tejto vibrácie je sledovaná tvorba tzv. **dubletu**, teda štiepenia vibračného pásu. Tento dublet vypovedá o veľmi tesnom (**orthorombickom**) usporiadaní metylénových reťazcov lipidov. Naopak tzv. **singlet**, teda nerozštiepený vibračný pás, vypovedá o voľnejšom (**hexagonálnom**) usporiadaní reťazcov. Pomocou týchto dát je možno sledovať aj miesiteľnosť lipidov v membránach. Napríklad o dobrej miešateľnosti by svedčila prítomnosť dubletu v plne protónovanej zmesi kdežto v zmesi kde by bola použitá deuterovaná masťná kyselina by deuterované a protónované tvorili singlet (reťazce s rozdielnymi izotopmi sa vzájomne neštiepia a nedochádza k vzniku dubletu).⁷⁷

Na obrázku 25 môžeme vidieť výsledky meraní deformačných nožnicových vibrácií modelových lipidových membrán s CerNH.



Obrázok 25 Výsledky meraní deformačnej nožnicovej vibrácie pri fyziologickej teplote ľudskej kože. Vľavo membrána A, Vpravo membrána B.

V membráne A bol pozorovaný dublet. To značí o orthorombickom usporiadaní lipidov v tejto membráne. Nie je však možné určiť čo a do akej miery sa podieľa na vzniku tejto špecifickej vibrácie.

Na rozdiel od toho v membráne B bol pozorovaný singlet protónovaných reťazcov, ktorý značí o hexagonálnom usporiadaní týchto reťazcov. V prípade deuterovaných reťazcov bol pozorovaný dublet, ktorý značí o tesnom orthorombickom usporiadaní. Keďže deuterované reťazce sú v membráne B zastúpené iba *d*-LIG, tieto dáta poukazujú na zhoršenú miešateľnosť a tvorbu tesných orthorombických domén. Zároveň je opäť možno tvrdiť, že reťazce mastnej kyseliny sú v tomto type membrány omnoho lepšie usporiadané než reťazce Cer.

3.2.4 Zhrnutie

Všetky tieto dáta popisujú vplyv hydroxylácie v polohe C6 sfingozínového reťazca Cer na biofyzikálne vlastnosti modelových lipidových membrán. Výsledky našich meraní poukazujú na zhoršenie miešateľnosti lipidov a tvorbu orthorombických separovaných domén mastných kyselín za prítomnosti CerNH. Namerané vlastnosti CerNH prisudzujeme vplyvu ďalšej hydroxylovej skupiny, keďže podobná separácia *d*-LIG bola pozorovaná v membránach obsahujúcich CerNP (taktiež tri OH skupiny na sfingoídnej báze). Na rozdiel od toho membrány obsahujúce CerNS a CerNdS (obidve obsahujúce iba dve OH skupiny na sfingoídnej báze) vykazovali dobrú miešateľnosť lipidov a tvorba domén *d*-LIG nebola pozorovaná.⁷⁸

4.1 Experimentálna časť - syntéza

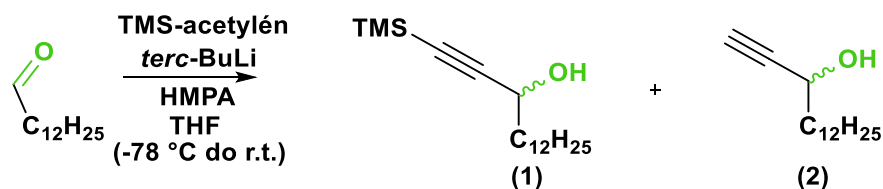
4.1.1 Technické parametre a chemikálie

Všetky východzie látky, činidlá, rozpúšťadlá a ďalšie chemikálie a materiály boli zaobstarané od zaužívaných dodávateľov: Sigma-Aldrich, Merck a PENTA. Cerebrónová kyselina bola pripravená synteticky v rámci iného projektu. Pre stĺpcovú chromatografiu bol používaný Silikagél 60 (230-400). Na kontrolu priebehu chemických reakcií, kontrolu čistoty produktov a charakterizáciu látok bola používaná tenkovrstevná chromatografia na hliníkových TLC doskách Silikagél 60 F254 (Merck). K detekcii vyvinutých dosiek bola použitá detekčná zmes $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, koncentrovaná kyselina sírová a voda. Pre detekciu voľných amínov bol použitý roztok Ninhydrínu. ^1H a ^{13}C NMR spektrá všetkých látok boli merané v roztokoch CDCl_3 (+MeOD) s prístrojom VARIAN VNMR S500, (500 MHz pre ^1H a 125 MHz pre ^{13}C NMR). IR spektrá boli získané za pomoci prístroja NICOLET 6700 FT-IR s ATR sondou. Na meranie hmostnostnej spektrometrie bol použitý prístroj LCQ Max advantage, Thermo Finnigan. Pre meranie optickej otáčanlivosti bol použitý prístroj Krüss optronic P3000 (Krüss GmbH).

4.1.2 Príprava 6-hydroxysfingozínu

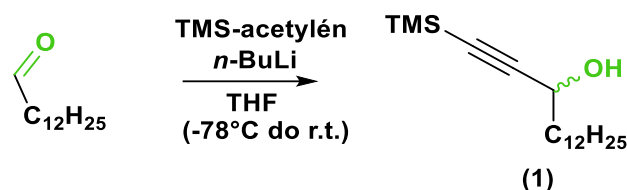
4.1.2.1 (*R,S*)-1-(trimethylsilyl)pentadec-1-yn-3-ol (1)

Postup a.)



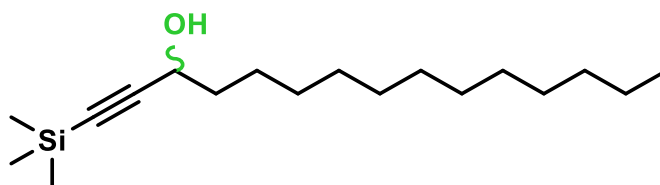
Do roztoku 1,83 g (18,631 mmol, 1,5 ekv.) trimethylsilylacetylénu v bezvodom THF (50 ml) bolo pridaných 1,2 ml HMPA (4,727 mmol, 0,375 ekv.). Následne bol za stáleho miešania postupne po kvapkách pridávaný roztok *tert*-BuLi (1.7M v hexáne, 12,5 ml, 1,5 ekv.) pri teplote -78 °C v inertnej atmosfére Ar. Po 2,5 hod prudkého miešania bolo do zmesi postupne pridávaných ďalších 1,2 ml HMPA (4,727 mmol, 0,375 ekv.) a po kvapkách roztok tridekanálu 2,5g (12,605 mmol, 1 ekv.) v bezvodom THF (15 ml). Reakčná zmes bola miešaná za zníženej teploty ďalšie 2 hod a potom pri laboratórnej teplote cez noc. Reakcia bola ukončená prídavkom roztoku NH₄Cl (50 ml) za vzniku bielych kryštálov v roztoku. Následne bola zmes extrahovaná EtOAc (3*50 ml) za prídavku nasýteného roztoku NaCl (10 ml). Vodná fáza bola spätne extrahovaná EtOAc (2*50 ml). Získaná organická fáza bola presušená pomocou Na₂SO₄ a odparená pod zníženým tlakom. Takto získaná zmes bola ďalej prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (mobilná fáza Hexán/EtOAc 20/1), aby sme získali 3,25 g nažltlého oleja (1) s výťažkom 87 % a 0,63 g bielej kryštalickej látky (2) s výťažkom 12 %.

Postup b.)



Do roztoku 1,86 g (18,937 mmol, 1 ekv.) trimethylsilylacetylénu v bezvodom THF (50 ml) bol za stáleho miešania postupne po kvapkách pridávaný roztok *n*-BuLi (1.6M v Hexáne, 12,5 ml, 1,5 ekv.) pri teplote -78 °C v inertnej atmosfére Ar. Po 3 hod prudkého miešania bol do zmesi po kvapkách pridávaný roztok tridekanálu 3,75 g (18,937 mmol, 1 ekv.) v bezvodom THF (10 ml). Reakčná zmes bola následne miešaná za zníženej teploty 3 hod a potom pri laboratórnej teplote cez noc. Reakcia bola ukončená prídavkom roztoku NH₄Cl (50 ml) za vzniku bielych kryštálov v roztoku reakčnej zmesi. Následne bola zmes extrahovaná EtOAc (3*50 ml) za prídavku nasýteného roztoku NaCl (10 ml). Vodná fáza bola spätne extrahovaná EtOAc (2*50 ml). Získaná organická fáza bola presušená pomocou Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto získaná zmes bola ďalej prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (mobilná fáza hexán/EtOAc 30/1), za vzniku 3,36 g nažltlého oleja (1) s celkovým výťažkom 55 %.

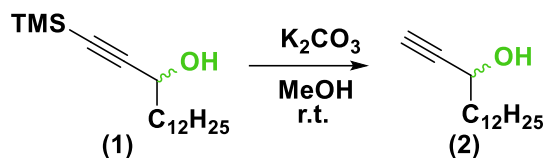
Charakterizácia (*R,S*)-1-(trimethylsilyl)pentadec-1-yn-3-olu (1)



TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 20/1, $R_f = 0,40$; Mobilná fáza CHCl₃/MeOH 10/1 $R_f = 0,30$;
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.34 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 1.76 – 1.61 (m, 2H), 1.51 – 1.38 (m, 2H), 1.37 – 1.22 (m, 18H), 0.91 – 0.83 (m, 3H), 0.17 (s, 9H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 107.03, 89.13, 62.83, 37.68, 31.89, 29.65, 29.62, 29.52, 29.48, 29.32, 29.20, 25.08, 22.65, 14.07, -0.16 ppm; **IR** ν_{max} 3317, 2923, 2854, 2172, 1466, 1378, 1250, 1030, 842, 760 cm⁻¹;
MS [M+H]⁺: vypočítaná hodnota 297,26 , nameraná hodnota 297.4; Ref.^{59,70}

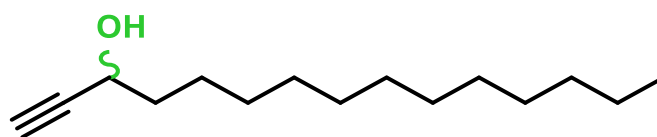
4.1.2.2 (*R,S*)-Pentadec-1-yn-3-ol (2)

Postup:



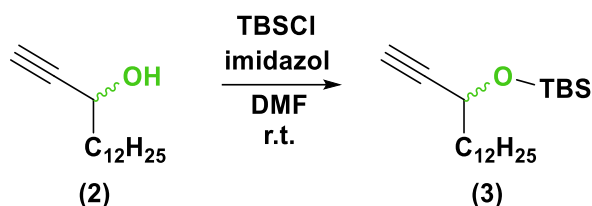
K roztoku 1,76 g chráneného alkynolu (1) (5,93 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom MeOH (35 ml) bolo postupne pridaných 2,16 g K_2CO_3 (15,63 mmol, 2,6 ekv.), za stáleho miešania. O 3 hod neskôr boli z reakčnej zmesi odparené rozpúšťadlá pod zníženým tlakom a zmes bola premytá vodou (40 ml). Následne bola zmes extrahovaná Et_2O (3*40 ml) s prídavkom nasýteného roztoku NaCl (20 ml). Organická fáza bola presušená pomocou Na_2SO_4 a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Vzniknutá zmes bola prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (mobilná fáza, Hexán/ EtOAc 20/1) za vzniku 1,32 g bielej kryštalickej látky (2) (5,88 mmol) s celkovým výt'azkom 99 %.

Charakterizácia (*R,S*)-Pentadec-1-yn-3-ol (2)



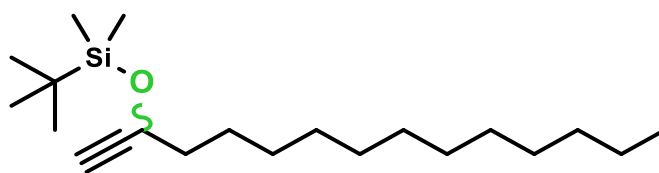
TLC: Mobilná fáza Hexán/ EtOAc 9/1 $R_f = 0,39$; **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CDCl_3) δ 4.38 (dt, $J = 6.6, 2.1$ Hz, 1H), 2.47 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 1.80 – 1.65 (m, 2H), 1.52 – 1.41 (m, 2H), 1.38 – 1.27 (m, 18H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, CDCl_3) δ 85.03, 72.80, 62.35, 37.66, 31.91, 29.65, 29.63, 29.54, 29.50, 29.34, 29.22, 25.00, 22.68, 14.10 ppm; **IR** ν_{max} 3332, 3283, 3218, 2915, 2848, 1466, 1091, 721 cm^{-1} ; **MS** $[\text{M}+\text{Na}]^+$: vypočítaná hodnota 247,20, nameraná hodnota 247,2 m/z; $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$: vypočítaná hodnota 239,24, nameraná hodnota 239,2 m/z; Ref.^{59,70}

4.1.2.3 (*R,S*)-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)pentadec-1-yn (3)



K roztoku 1,20 g ochráneného alkynolu (2) (4,457 mmol, 1,0 ekv.) a 0,76 g imidazolu (6,686 mmol, 2,5 ekv.) v bezvodom DMF (10 ml) bol za stáleho miešania po kvapkách pridávaný roztok 1,04 g *tert*-butyldimethylsilylchloridu (6,686 mmol, 1,5 ekv.), v bezvodných podmienkach a inertnej atmosfére Ar, pri 0 °C v ľadovej lázni. Reakcia bola následne miešaná pri r.t. po dobu 6 hod. Následne bola reakcia ukončená pridaním vody (75 ml) a reakčná zmes extrahovaná Et₂O (3*100 ml). Organická fáza bola dosušená Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Vzniknutá zmes bola prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (mobilná fáza Hexán/EtOAc 30/1) za vzniku 1,80 g priehľadného oleja (3) (5,315 mmol) s celkovým výtťažkom 99 %.

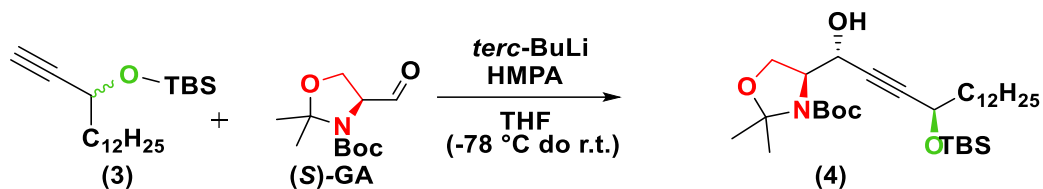
Charakterizácia (*R,S*)-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)pentadec-1-yn (3)



TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 4/1, $R_f = 0,90$; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 4.34 (dt, $J = 6.5, 2.1$ Hz, 1H), 2.37 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), 1.27 (m, 18H), 0.94 – 0.86 (m, 12H), 0.14 (d, $J = 12.1$ Hz, 6H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 85.81, 71.82, 62.79, 38.60, 31.94, 29.69, 29.66, 29.59, 29.56, 29.37, 29.26, 25.78, 25.13, 22.70, 18.23, 14.12, -4.57, -5.07; **IR** ν_{max} 3313, 2926, 2855, 1464, 1361, 1251, 1097, 1005, 939, 837, 777, 721 cm⁻¹; **MS** [M+H]⁺: vypočítaná hodnota 339,31, nameraná hodnota 339,5; $[\alpha]_{25}^D = +0,41$ (c = 0,7, CHCl₃).

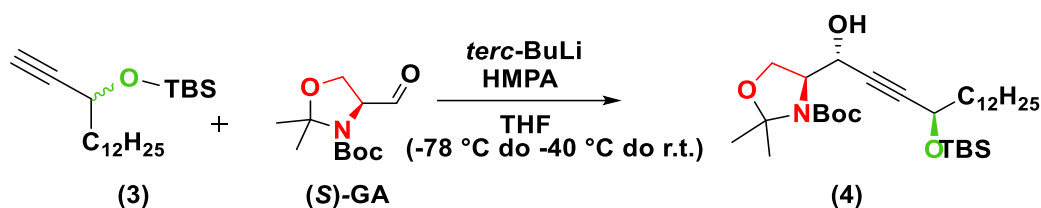
4.1.2.4 *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimethylloxazolidin-3-karboxylát (4)

Postup a.)



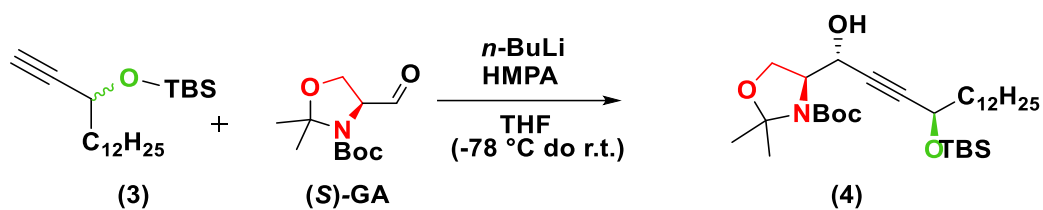
K roztoku 0,69 g (3) (2,042 mmol, 1 ekv.) v bezvodom THF (10 ml) bolo za stáleho miešania po kvapkách pridaných 1,9 ml roztoku *tert*-BuLi (1,7M v Hexáne, 3,063 mmol, 1,2 ekv.) pri teplote -78 °C v bezvodých podmienkach pod inertnou atmosférou Ar. Roztok bol intenzívne miešaný po dobu 2 hod a následne bol pomaly pridaný 0,7 ml HMPA (4,084 mmol, 2 ekv.). O 20 minút neskôr bol do reakčnej zmesi po kvapkách pridaný roztok 0,70 g (*S*)-GA (3,036 mmol, 1,5 ekv.) v bezvodom THF (5 ml). Zmes bola za intenzívneho miešania ponechaná reagovať pri laboratórnej teplote cez noc. Reakcia bola ukončená prídavkom vodného roztoku NH₄Cl (25ml) a extrahovaná pomocou Et₂O (3*30 ml) a nasýteného roztoku NaCl (20 ml). Organická fáza bola následne dosušená pomocou Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto vzniknutá zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza, gradientová elúcia. Hexán/EtOAc 30/1, 15/1 až 1/1) za vzniku 0,86 g nažltlého oleja (4) (1,514 mmol) s celkovým výťažkom 74 %.

Postup b.)



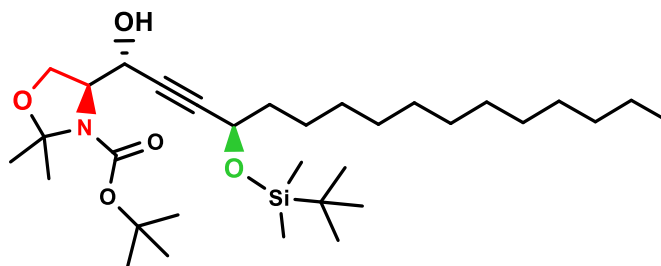
K roztoku 1,50 g (3) (4,417 mmol, 1 ekv.) v bezvodom THF (40 ml) bolo za stáleho miešania po kvapkách pridaných 3,1 ml roztoku *tert*-BuLi (1,7M v Hexáne, 1,2 ekv.) pri teplote -78 °C v bezvodých podmienkach pod inertnou atmosférou Ar. Roztok bol intenzívne miešaný po dobu 1 hod a následne bolo pomaly pridaných 1,92 ml HMPA (11,042 mmol, 2,5 ekv.) a reakčná zmes bola ohriata na -40 °C. O 1 hod neskôr bol do reakčnej zmesi po kvapkách pridaný roztok 1,21 g (S)-GA (5,300 mmol, 1,2 ekv.) v bezvodom THF (5 ml). Zmes bola za intenzívneho miešania ponechaná reagovať pri teplote -40 °C 3 hod a potom pri laboratórnej teplote 48 hod. Reakcia bola ukončená prídavkom vodného roztoku NH₄Cl (50 ml) a extrahovaná pomocou Et₂O (3*60 ml) a nasýteného roztoku NaCl (20 ml). Organická fáza bola následne dosušená pomocou Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto vzniknutá zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza, gradientová elúcia. Hexán/EtOAc 30/1, 19/1, 15/1 až 1/1) za vzniku 1,50 g nažltlého oleja (4) (2,641 mmol) s celkovým výtťažkom 60 %.

Postup c.)



K roztoku 0,5 g (3) (1,476 mmol, 1 ekv.) v bezvodom THF (10 ml) bolo za stáleho miešania po kvapkách pridaných 1,3 ml roztoku *n*-BuLi (1,6 M v Hexáne, 1,4 ekv.) pri teplote -78 °C v bezvodých podmienkach pod inertnou atmosférou Ar. Roztok bol intenzívne miešaný po dobu 3,5 hod a následne bol pomaly pridaný roztok 0,5 g (S)-GA (2,220 mmol, 1,5 ekv.) v bezvodom THF (5 ml) a hneď potom pridaných 1,92 ml HMPA (2,960 mmol, 2,0 ekv.). Zmes bola za intenzívneho miešania ponechaná reagovať pri laboratórnej teplote cez noc. Reakcia bola ukončená prídavkom vodného roztoku NH₄Cl (50 ml) a extrahovaná pomocou Et₂O (3*50 ml) a nasýteného roztoku NaCl (10 ml). Organická fáza bola následne dosušená pomocou Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto vzniknutá zmes bola čistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza, Hexán/EtOAc 20/1) za vzniku 0,43 g nažltlého oleja (4) (0,757 mmol) s celkovým výťažkom 40 %.

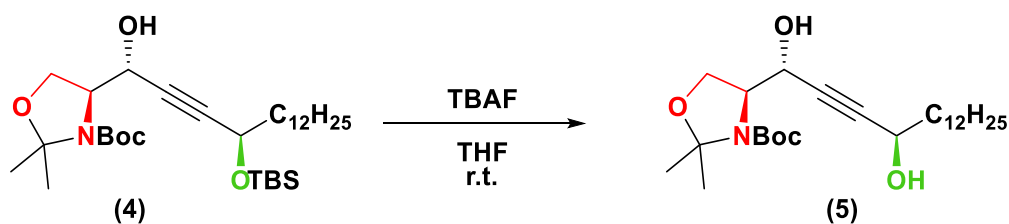
Charakterizácia *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylátu (4)



TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 4/1, $R_f = 0,57$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.81 – 4.44 (m, 1H), 4.39 – 4.32 (m, 1H), 4.17 – 4.04 (m, 2H), 4.00 – 3.87 (m, 1H), 1.67 – 1.58 (m, 4H), 1.53 – 1.46 (m, 9H), 1.43 – 1.33 (m, 2H), 1.33 – 1.20 (m, 25H), 0.93 – 0.85 (m, 9H), 0.13 – 0.05 (m, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 153.90, 94.94, 87.88, 81.45, 81.20, 64.85, 63.78, 62.86, 62.84, 38.59, 31.88, 31.55, 29.64, 29.61, 29.56, 29.51, 29.32, 29.21, 28.36, 27.68, 25.94, 25.75, 25.18, 25.08, 22.65, 18.16, 14.08, -4.46, -5.07; **IR** ν_{max} 3313, 2927, 2855, 1748, 1705, 1694, 1671, 1463, 1391, 1366, 1251, 1172, 1085, 837, 777, 734 cm^{-1} ; **MS** $[\text{M}+\text{H}]^+$: vypočítaná hodnota 568,44, nameraná hodnota 568,6; $[\alpha]_{25}^{\text{D}} = +4,76$ ($c = 1,8$, CHCl_3); Ref. ^{59,68,69,70}

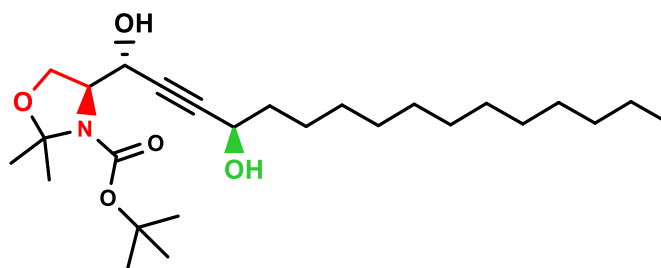
4.1.2.5 *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*)-1,4-dihydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidin-3-karboxylát (5)

Postup:



K roztoku 0,53 g (4) (0,927 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom THF (10 ml) bolo postupne pridaných 1,2 ml roztoku TBAF (1M v Hexáne, 1,112 mmol, 1,2 ekv.) v bezvodých podmienkach pod inertnou atmosférou Ar pri 0 °C v ľadovej lázni. Po 20 minútach bola reakcia vybraná z ľadovej lázne a miešaná za laboratórnej teploty po dobu 2 hod. Následne boli odparené rozpúšťadlá pod zníženým tlakom. Takto získaná zmes bola priamo čistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (gradientová elúcia, mobilná fáza Hexán/EtOAc 3/1 2/1 1/1) za vzniku 0,42 g priehľadného oleja (5) (0,925 mmol) s celkovým výtťažkom 99 %.

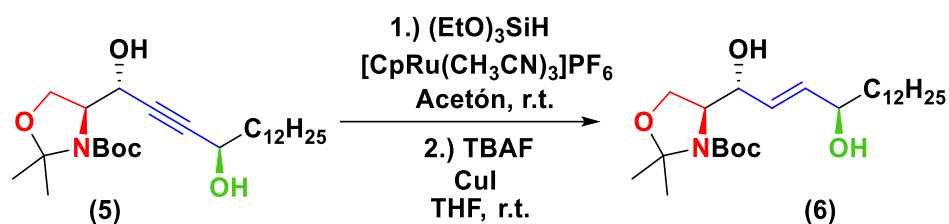
Charakterizácia *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*)-1,4-dihydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (5)



TLC: Mobilná fáza Hexán/EtOAc 4/1, $R_f = 0,09$, mobilná fáza Hexán/EtOAc 1/1, $R_f = 0,81$;
 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.58 – 4.55 (m, 1H), 4.35 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.18 – 4.13 (m, 1H), 4.09 – 4.02 (m, 1H), 3.98 – 3.94 (m, 1H), 1.75 – 1.55 (m, 6H), 1.50 (m, 6H), 1.45 – 1.22 (m, 25H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, CDCl_3) δ 154.10, 94.90, 87.19, 82.80, 81.41, 64.92, 63.81, 62.32, 62.22, 62.20, 37.62, 37.54, 31.87, 29.63, 29.60, 29.56, 29.51, 29.30, 29.25, 28.35, 26.10, 25.14, 25.06, 22.64, 14.06; **IR** ν_{max} 3401, 2925, 2854, 2247, 1682, 1457, 1393, 1367, 1260, 1171, 1114, 1085, 1066. 909, 848, 769, 733 cm^{-1} ; **MS** $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$: vypočítaná hodnota 354,30, nameraná hodnota 354,5; $[\alpha]_{25}^{\text{D}} = +4,76$ ($c = 1,8$, CHCl_3); Ref. 59,68,69,70

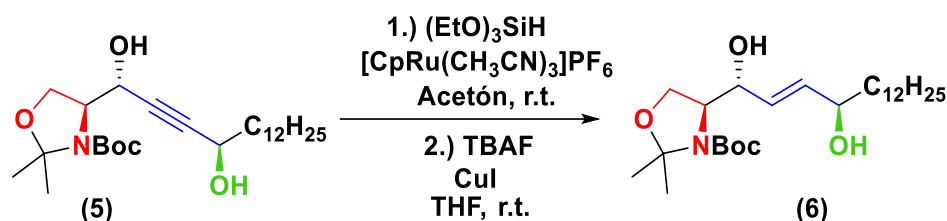
4.1.2.6 *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*,2*E*)-1,4-dihydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (6)

Postup a.)



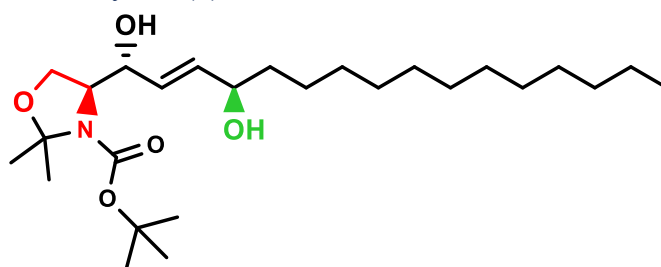
K roztoku 233 mg (5) (0,511 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom acetóne (1 ml) bolo pridaných 280 μl trietoxysilánu (1,540 mmol, 3,0 ekv.) za bezvodých podmienok v inertnej atmosfére Ar pri $0\text{ }^\circ\text{C}$ v ľadovej lázni. Po 20 minútach bol pridaný roztok 2,2 mg $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]\text{PF}_6$ (5,1 μmol , 0,01 ekv.) v bezvodom acetóne (1ml). Reakcia bola miešaná pri zníženej teplote 2 hod a následne boli rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Do tejto zmesi bol pridaný CuI (5 mg) a bezvodý THF (2 ml). Po rozpustení všetkých zložiek bola reakčná zmes znova schladená na teplotu $0\text{ }^\circ\text{C}$ v ľadovej lázni. Následne bolo po kvapkách pridávaných 1,54 ml roztoku TBAF (1M, v Hexáne, 1,540 mmol, 1,5 ekv.) a reakcia bola miešaná pri laboratórnej teplote cez noc. Reakcia bola ukončená prídavkom 10 ml vody a extrahovaná Et_2O (3*200 ml) s prídavkom vody (300 ml) a nasýteného vodného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Organická fáza bola dosušená pomocou Na_2SO_4 a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Získaná zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (mobilná fáza, Hexán/ EtOAc 1/1) za vzniku 177 mg nažltlého oleja (6) (0,388 mmol) s celkovým výťažkom 76 %.

Postup b.)



K roztoku 58 mg (5) (0,129 mmol, 1,0 ekv.) v bezvodom acetóne (1 ml) bolo pridaných 72 μl trietoxysilánu (0,387 mmol, 3,0 ekv.) za bezvodých podmienok v inertnom prostredí Ar a zvýšenej teploty (40 °C). Následne bol do reakčnej zmesi pridaný roztok 0,6 mg $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]\text{PF}_6$ (1,29 μmol , 0,01 ekv.) v bezvodom acetóne (1 ml). Reakcia bola miešaná za zvýšenej teploty 50 minút a následne schladená na 0 °C (ľadová lázeň), nariadená bezvodým THF (1,5 ml) a po kvapkách bolo pridaných 0,39 ml roztoku TBAF (1M, v Hexáne, 0,387 mmol, 3,0 ekv.) a reakcia bola miešaná pri laboratórnej teplote cez noc. Reakcia bola ukončená prídavkom 10 ml vody a extrahovaná Et_2O (3*200 ml) s prídavkom vody (300 ml) a nasýteného vodného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Organická fáza bola dosušená pomocou Na_2SO_4 a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Získaná zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (mobilná fáza, Hexán/ EtOAc 1/1) za vzniku 18 mg nažltlého oleja (6) (0,039 mmol) s celkovým výťažkom 30 %.

Charakterizácia *tert*-butyl (*S*)-4-((1*R*,4*R*,2*E*)-1,4-dihydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (6)

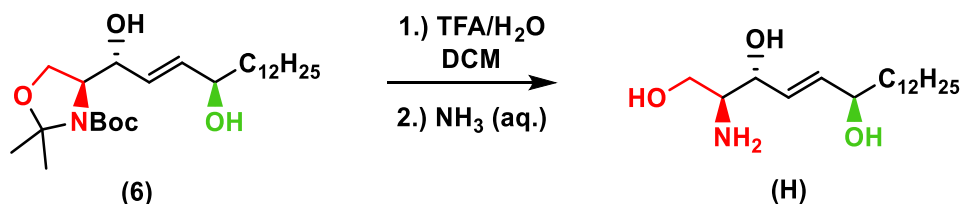


TLC: Mobilná fáza Hexán/ EtOAc 1/1. $R_f = 0,68$; **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CDCl_3) δ 5.82 (dd, $J = 15.5, 6.1$ Hz, 1H), 5.69 (dd, $J = 15.7, 5.6$ Hz, 1H), 4.27 – 4.22 (m, 1H), 4.17 – 4.08 (m, 2H), 4.07 – 3.97 (m, 1H), 3.89 – 3.86 (m, 1H), 1.69 – 1.41 (m, 15H), 1.26 (s, 22H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, CDCl_3) δ 135.33, 128.96, 94.49, 81.24, 73.63, 72.22, 64.85, 62.09, 37.26, 31.89, 29.65, 29.64, 29.62, 29.59, 29.56, 29.46, 29.33, 29.15, 28.36, 26.40, 25.43, 24.90, 24.37, 22.66, 14.09. **IR** ν_{max} 3401, 2924, 2854, 1698, 1674, 1456, 1392, 1366, 1256, 1206, 1172, 1100, 1070, 1051, 971, 847, 808, 768, 740 cm^{-1} ; **MS** $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$: vypočítaná hodnota 356,32, nameraná hodnota 356,5; Ref. ^{59,68,69,70}

Poznámka: Pri charakterizácii látky (6) bol opakovane nameraný ión hmotnostne odpovedajúci sodnému aduktu 6-hydroxysfingozínu. Zrejme pri ionizácii dochádzalo k odchráneniu hlavy (6) $[M(H)+Na]^+$: vypočítaná hodnota 338,27, nameraná hodnota 338,5 m/z.

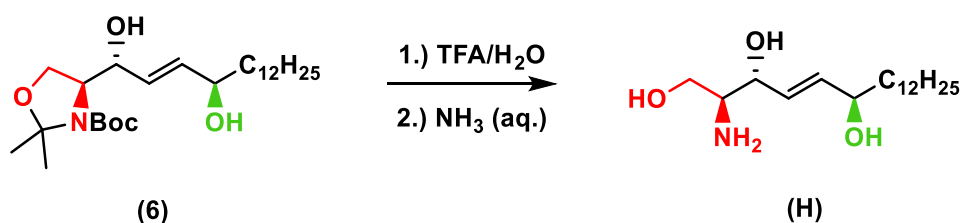
4.1.2.7 (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol (7), 6-hydroxysfingozín

Postup a.)



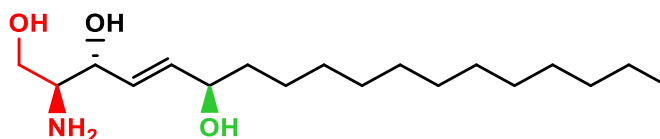
K roztoku 140 mg (6) (0,306 mmol) v bezvodom DCM (1 ml) bol za stáleho miešania postupne po kvapkách pridávaný vodný roztok TFA (1,5 ml, 3,75 TFA/1 H₂O) pri 0 °C v ľadovej lázni. Po 5 minútach bola ľadová lázeň odobraná a reakcia bola miešaná za laboratórnej teploty 3 hod. Reakcia bola ukončená alkalizáciou na pH=9 prídavkom nasýteného vodného roztoku NH₃. Zmes bola ďalej extrahovaná CHCl₃ (3*100 ml) a nasýteným roztokom NaCl (10 ml). Organická fáza bola dosušená Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto pripravená zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (mobilná fáza, CHCl₃/i-PrOH/MeOH/DEA 40/30/20/0,1) za vzniku 72 mg voskovitej látky (7) (0,300 mmol) pozitívne reagujúcej na detekciu ninhydrínom. Celkový výťažok reakcie bol 75 %.

Postup b.)



109 mg (6) (0,237 mmol) bolo resuspendovaných v 0,5 ml vody a za stáleho miešania postupne pridávaný vodný roztok TFA (3,0 ml, 3,75 TFA/1 H₂O, v/v) pri 0 °C v ľadovej lázni. Po 2 hod bola zmes alkalizovaná na pH=9 prídavkom nasýteného vodného roztoku NH₃. Vzniknutá suspenzia bola extrahovaná CHCl₃ (3*30 ml) a nasýteným roztokom NaCl (10 ml). Organická fáza bola dosušená Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto pripravená zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle alkalizovanom NH₃ (mobilná fáza CHCl₃/MeOH/konc. NH₃ 140/25/4) za vzniku 55 mg voskovitej látky (7) pozitívne reagujúcej na detekciu ninhydrínom. Celkový výťažok bol 74 %.

Charakterizácia (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triolu (7),
6-hydroxysfingozínu, (H)



TLC: Mobilná fáza CHCl₃/iPrOH/MeOH/DEA 30/30/30/0,1 , $R_f = 0,65$; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD 5/1) δ 5.64 (dd, $J = 15.5, 6.3$ Hz, 1H), 5.50 (dd, $J = 15.5, 6.5$ Hz, 1H), 3.57 – 3.50 (m, 1H), 3.50 – 3.40 (m, 1H), 2.81 – 2.73 (m, 1H), 1.45 – 1.29 (m, 2H), 1.20 – 1.08 (m, 22H), 0.74 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

Poznámka: signál 3,57-3,50 ppm bol v spektre prekrytý zbytkovým MeOH v rozpúšťadle. Po obmene MeOD za i-PrOD, teda zloženie finálnej zmesi rozpúšťadiel bolo CDCl₃/i-PrOD 5/1, bol už signál spoľahlivo detekovaný.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃/MeOD 5/1) δ 140.29, 132.66, 76.33, 75.61, 66.10, 60.36, 40.81, 35.76, 33.52, 33.51, 33.48, 33.46, 33.19, 29.42, 29.36, 26.51, 17.83; **IR** ν_{max} 3316, 3275, 2955, 2920, 3850, 1602, 1564, 1558, 1468, 1405, 1377, 1339, 1311, 1136, 1074, 1040, 1007, 978, 905, 873, 831, 721, 648 cm⁻¹; **MS** [M+H]⁺: vypočítaná hodnota 316,28, nameraná hodnota 316,4 m/z; [M+H-H₂O]⁺: vypočítaná hodnota 298,24, nameraná hodnota 298,4 m/z; [M+H-2*H₂O]⁺: vypočítaná hodnota 280,26, nameraná hodnota 280,4 m/z; [M+Na]⁺: vypočítaná hodnota 338,27, nameraná hodnota 338,5 m/z; Ref. ^{68,69}

4.1.3 LC/MS hodnotenie vplyvu prídavku HMPA na alkynyláciu (S)-GA

Pre tento experiment boli súbežne skúmané dve reakčné zmesi. Reakčná zmes a.), ktorá predstavovala alkynyláciu Garnerovho aldehydu za štandardných podmienok aké boli použité pri syntéze; reakčná zmes b.), ktorá bola identická až na absenciu HMPA. Príprava reakčných zmesí, úprava vzoriek a podmienky samotného merania sú popísané nižšie.

Reakčná zmes a.)

Pre prípravu reakčnej zmesi a.) bolo k roztoku 35 mg (3) (0,105 mmol, 1 ekv.) v bezvodom THF (1 ml) za stáleho miešania po kvapkách pridaných 0,1 ml roztoku *tert*-BuLi (1,7M v Hexáne, 0,136 mmol, 1,3 ekv.) pri teplote -78 °C v bezvodých podmienkach pod inertnou atmosférou Ar. Roztok bol intenzívne miešaný po dobu 2 hod a následne bol pomaly pridaný 0,04 ml HMPA (0,210 mmol, 2 ekv.). O 20 minút neskôr bol do reakčnej zmesi po kvapkách pridaný roztok 36 mg (S)-GA (0,1568 mmol, 1,5 ekv.) v bezvodom THF (0,1 ml). Zmes bola miešaná za laboratórnej teploty až do ďalšej manipulácie.

Reakčná zmes b.)

Pre prípravu reakčnej zmesi b.) bolo k roztoku 35 mg (3) (0,105 mmol, 1 ekv.) v bezvodom THF (1 ml) za stáleho miešania po kvapkách pridaných 0,1 ml roztoku *tert*-BuLi (1,7M v Hexáne, 0,136 mmol, 1,3 ekv.) pri teplote -78 °C v bezvodých podmienkach pod inertnou atmosférou Ar. Roztok bol intenzívne miešaný po dobu 2 hod a následne bol do reakčnej zmesi po kvapkách pridaný roztok 36 mg (S)-GA (0,1568 mmol, 1,5 ekv.) v THF (0,1 ml). Zmes bola miešaná za laboratórnej teploty až do ďalšej manipulácie.

Úprava vzoriek pred meraním:

V danom čase (2 hod; 24 hod) bolo z každej reakčnej zmesi odobraných 0,1 ml do vysušenej vialky. Reakcia vo vialkách bola ukončená prídavkom 0,2 ml nasýteného roztoku NH₄Cl a 0,1 ml H₂O. Následne bolo pridaných 0,5 ml CHCl₃ a roztok bol vortexovaný po dobu jednej minúty. Organická fáza bola pozorne odobraná do ďalšej vialky a rozpúšťadlo odparené pod prúdom N₂. Takto získaná zmes bola rozpustená v 1 ml zmesi (CHCl₃/MeOH 10/1) a analyzovaná ako je popísané nižšie.

Podmienky analýzy:

Separácia a hmotnostná detekcia bola meraná na kvapalinovom chromatografe spojenom s hybridným hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením využívajúcim spojenie kvadrupólu s analyzátorom doby letu - Synapt G2-Si.

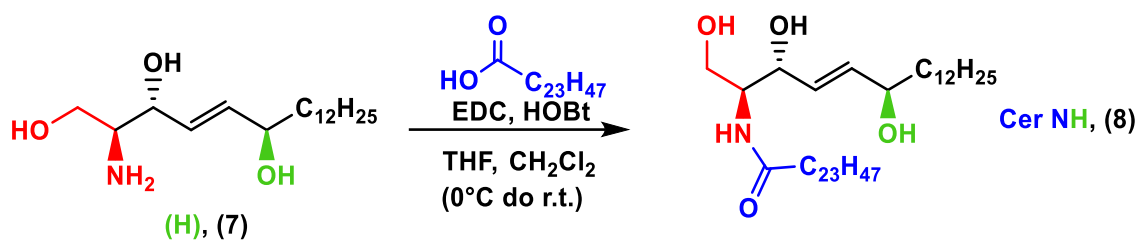
Podmienky pre kvapalinovú chromatografiu boli: kolóna s reverznou fázou C18 o dĺžke 100 mm a vnútorným priemerom 2,1 mm, s časticami o veľkosti 1,7 μm . Bola využitá gradientová elúcia, a to od 98 % zložky A (0,1% vodný roztok mravenčej kyseliny) a 2 % zložky B (0,1% mravenčia kyselina v acetonitrile) do 2 % zložky A 98 % zložky B, behom 15 minút. Prietoková rýchlosť bola 0,5 ml/min. Vstrekaný objem vzorku bol 2 μl .

Podmienky pro hmotnostnú detekciu boli ionizácia v pozitívnom móde. Nastavenie iónového zdroja bolo: napätie na kapiláre 2,5 kV, napätie na vstupnom kuželi 20 V, tlak zmlžujúceho plynu 6,5 bar, prietok desolvatačného plynu bol 1100 l/h, desolvatačná teplota 600 °C a teplota v zdroji 120 °C. Nastavenie skenu bolo 12 skenov za sekundu. Rozsah skenovaných hmôt bol 50–1200 m/z. Ako interný kalibrant bol použitý referenčný sprej: leucín-enkefalín (koncentrácia: 200 pg/l). Pre externú kalibráciu bol použitý roztok mravenčanu sodného o koncentracii 0,5 mmol/l.

4.1.4 Príprava H-Ceramidov

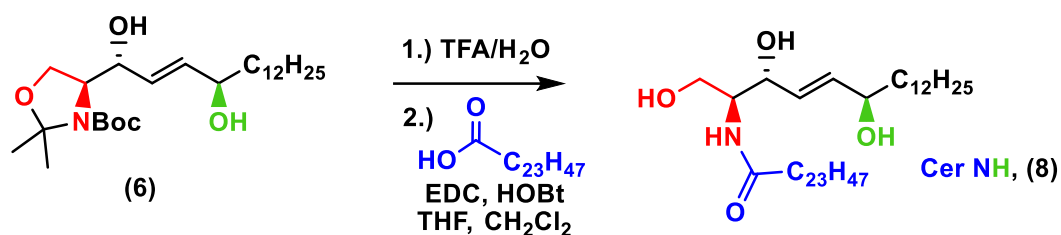
4.1.4.1 (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-*N*-Tetrakosanoyl-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol (8), Cer NH

Postup a.)



Pre prípravu CerNH bolo k roztoku 10 mg (7) (0,032 mmol, 1,0 ekv.), 14 mg LIG (0,038 mmol, 1,2 ekv.) a 16 mg HOBt (0,118 mmol, 3,7 ekv.) v bezvodom THF (3 ml) a bezvodom DCM (1,5 ml) za stáleho miešania pridávaný po kvapkách 30 μl EDC (0,127 mmol, 4,0 ekv.) v bezvodých podmienkach a inertnej atmosfére Ar pri 0°C v ľadovej lázni. Reakčná zmes bola následne miešaná pri laboratórnej teplote po dobu 72 hod. Reakcia bola ukončená prídavkom vody (25 ml) a extrahovaná CHCl_3 (3*25 ml) s prídavkom nasýteného roztoku NaCl (10 ml). Organická fáza bola dosušená Na_2SO_4 a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto získaná zmes bola prečistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (gradientová elúcia. Mobilná fáza, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100/1 80/1 50/1 10/1) za vzniku 19 mg bielej kryštalickej látky (8) (0,029 mmol) s celkovým výťažkom 90 %.

Postup b.)

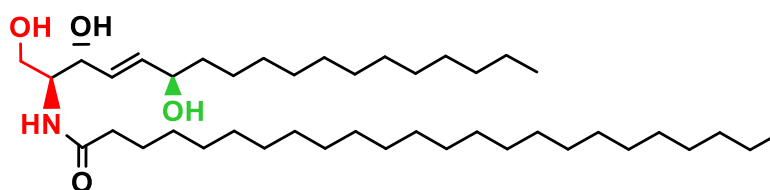


Príprava CerNH bola taktiež skúšaná ako dvojkroková syntéza bez čistenia (7).

Ku 30 mg chránenej sfingoídnej báze (6) (0,066 mmol, 1,0 ekv.) bol pridaný vodný roztok TFA (TFA/H₂O, 3,75/1, v/v) za laboratórnej teploty. Roztok bol miešaný 3 hod, potom bola reakcia ukončená alkalizáciou na pH=9 prídavkom nasýteného vodného roztoku NH₃. Zmes bola následne extrahovaná CHCl₃ (3*30 ml). Organická fáza bola zahustená pod zníženým tlakom za vzniku 30 mg zmesi, ktorá bola použitá do ďalšej reakcie, bez ďalšieho čistenia.

Ku surovému produktu predošlej reakcie bolo dovážených 35 mg LIG (0,094 mmol, 1,4 ekv.) a 45 mg HOBT (0,282 mmol, 4,2 ekv.). Do tejto zmesi boli pridané bezvodý THF (3 ml) a bezvodý DCM (3 ml). Zmes bola ponechaná miešať až do úplného rozpustenia všetkých látok. Následne bola zmes schladená na 0 °C v ľadovej lázni a bolo pridaných 35 μl EDC (0,148 mmol, 2,2 ekv.). Po 1 hod bola reakčná zmes vybraná z ľadovej lázne a ponechaná miešať pri laboratórnej teplote 72 hod. Zo zmesi boli rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom a zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (gradientová elúcia, mobilná fáza, CHCl₃/MeOH 120/1 60/1 20/1). Výsledný produkt (8) sa však nepodarilo izolovať v dostatočnom množstve k ďalšej manipulácii.

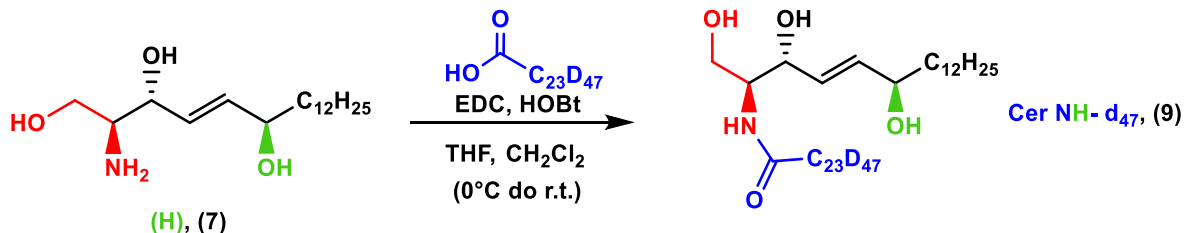
Charakterizácia (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-*N*-Tetrakosanoyl-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol (8), Cer NH



TLC: Mobilná fáza CHCl₃/MeOH 10/1, *R_f* = 0,54; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD 10/1) δ 5.66 (dd, *J* = 15.4, 6.2 Hz, 1H), 5.58 (dd, *J* = 15.5, 5.8 Hz, 1H), 4.19 – 4.08 (m, 1H), 4.03 – 3.92 (m, 1H), 3.83 – 3.69 (m, 2H), 3.62 – 3.51 (m, 1H), 2.17 – 2.09 (m, 2H), 1.66 – 1.48 (m, 2H), 1.36 – 1.05 (m, 62H), 0.81 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃/MeOD 10/1) δ 174.28, 135.92, 128.50, 71.85, 71.61, 62.64, 52.76, 36.83, 36.46, 34.04, 31.77, 29.56, 29.54, 29.49, 29.42, 29.36, 29.27, 29.20, 29.16, 29.02, 25.64, 25.37, 24.72, 22.52, 17.83, 13.90; **IR** *v*_{max} 3285, 2955, 2919, 2850, 2196, 2090, 1723, 1643, 1550, 1469, 1377, 1250, 1100, 1048, 965, 832, 726 cm⁻¹; **MS** [M+H-H₂O]⁺: vypočítaná hodnota 648,63, nameraná hodnota 648,8 m/z; [M+H-2*H₂O]⁺: vypočítaná hodnota 630,62, nameraná hodnota 630,8 m/z; Ref. ^{59,70}

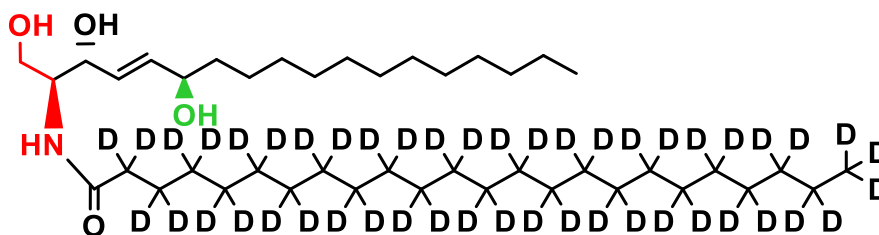
4.1.4.2 (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-*N*-Tetrakosanoyl-*d*₄₇-2-aminooctadec-4-en-1,3,6-triol (Cer NH-*d*₄₇) (9)

Postup:



Pre prípravu Cer NH-*d*₄₇ bolo k roztoku 15 mg (7) (0,048 mmol, 1,0 ekv.), 24 mg *d*₄₇-lignocerovej kyseliny (0,058 mmol, 1,2 ekv.) a 24 mg HOBt (0,178 mmol, 3,7 ekv.) v bezvodom THF (3 ml) a bezvodom DCM (1,5 ml) za stáleho miešania pridávaný po kvapkách 45 μl EDC (0,192 mmol, 4,0 ekv.) v bezvodých podmienkach a inertnej atmosfére Ar pri 0 °C v ľadovej lázni. Reakčná zmes bola následne miešaná pri laboratórnej teplote po dobu 72 hod. Reakcia bola ukončená prídavkom vody (25 ml) a extrahovaná CHCl₃ (3*25 ml) s prídavkom nasýteného roztoku NaCl (10 ml). Organická fáza bola dosušená Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Takto získaná zmes bola prečistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (gradientová elúcia. Mobilná fáza, CHCl₃/MeOH 100/1 80/1 50/1 10/1) za vzniku 33 mg bielej kryštalickej látky (9) (0,046 mmol) s celkovým výťažkom 95 %.

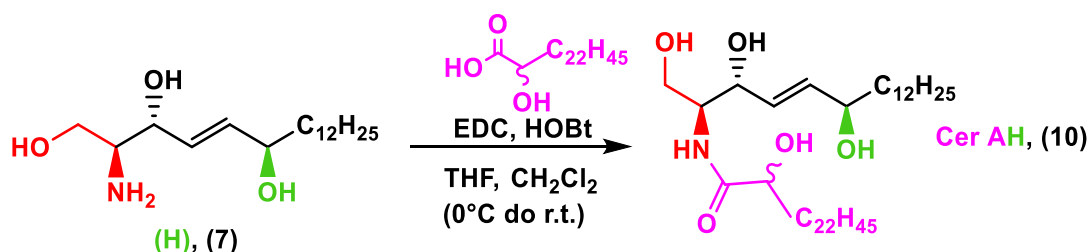
Charakterizácia (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-*N*-Tetrakosanoyl-*d*₄₇-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triolu (Cer NH-*d*₄₇) (9)



TLC: Mobilná fáza CHCl₃/MeOH 10/1, *R*_f = 0,52 CHCl₃/MeOH 19/1, *R*_f = 0,39;

Charakterizácia tejto látky sa zhoduje s literatúrou. Ref. ⁷⁹

4.1.4.3 (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*,2'*R*/*S*)-*N*-2'-hydroxy-Tetrakosanoyl-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol (10), Cer AH



Pre prípravu CerAH bolo k roztoku 7 mg (7) (0,022 mmol, 1,0 ekv.), 10 mg racemickej cerebrónovej kyseliny (0,027 mmol, 1,2 ekv.) a 11 mg HOBt (0,082 mmol, 3,7 ekv.) v bezvodom THF (2 ml) a bezvodom DCM (1,0 ml) za stáleho miešania pridávaný po kvapkách 8 μ l EDC (0,044 mmol, 2,0 ekv.) v bezvodých podmienkach a inertnej atmosfére Ar pri 0 °C v ľadovej lázni. Reakčná zmes bola následne miešaná pri laboratórnej teplote 72 hod. Reakcia bola ukončená prídavkom vody (25 ml) a extrahovaná CHCl₃ (3*25 ml) s prídavkom nasýteného roztoku NaCl (10 ml). Organická fáza bola dosušená Na₂SO₄ a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Získaná zmes bola prečistená stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (Mobilná fáza, CHCl₃/MeOH/*i*-PrOH 200/1/1). Takto bol izolovaný a charakterizovaný neznámy diastereomer CerAH (10) o hmotnosti 7 mg (0,010 mmol) s výťažkom 47 %. Celkovo boli izolované tri látky z toho dve odpovedajúce dvom diastereomérom CerAH a jedna odpovedajúca CerNH.

4.2 Experimentálna časť - Hodnotenie lipidových membrán s CerNH

4.2.1 Technické parametre a chemikálie

Chemikálie a rozpúšťadlá boli zakúpené od firiem Sigma-Aldrich, Avanti-Polar Lipids a PENTA. Deuterované lipidy (*d*-LIG) boli zakúpené od firmy C/D/N isotopes. IČ spektrá boli namerané na prístroji Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo scientific) s kryštálom MIRacle ATR ZnSe (PIKE Technologies).

4.2.2 Príprava modelových lipidových membrán

Modelové lipidové membrány boli pripravené zmiešaním Cer (CerNH), Chol a FFA (LIG/*d*-LIG) v ekvimolárnom množstve (1/1/1 Cer/LIG/Chol) s prídavkom 5 % (m/m) CholS. Celkovo boli pripravené dva typy modelových lipidových membrán. Tieto membrány sa medzi sebou líšili rôznym typom reťazcov (protonovaný/deuterovaný) mastnej kyseliny.

Jednotlivé lipidy boli rozpustené v zmesi Hexán/EtOH 96 % (2/1, v/v). CholS bol rozpustený v EtOH 96 % (dôvodom bola nízka rozpustnosť v predošlej zmesi). Výsledné roztoky boli zahustené a vysušené nad P₂O₅ v exsikátore. Lipidové zmesi boli ohriate na 90 °C, teda nad teplotu hlavných fázových prechodov všetkých lipidov. Takto pripravené zmesi boli ohrievané na tejto teplote 10 min a následne 3 hod chladli pri laboratórnej teplote. Proces chladnutia je dôležitý, keďže pri ňom dochádza k tvorbe študovaných lipidových lamiel. Následne boli tieto modelové membrány inkubované pri laboratórnej vlhkosti a teplote 32 °C po dobu 24 hod.

Takto pripravené modelové lipidové membrány boli priamo nanosené na ATR kryštál a študované pomocou termotrópnej IČ spektroskopie pri teplote od 28 °C do 100 °C, pričom jednotlivé spektrá boli zaznamenávané každé 2 °C. Medzi jednotlivými meraniami boli vzorky ponechané stabilizovať 6 min. Zmesi boli merané v duplikátoch.

4.2.3 Spracovanie dát

Celkovo bolo nameraných 144 IČ spektier. Dáta boli spracované pomocou nasledujúcich programov: OPUS (Brucker), GraphPad a Microsoft Excel.

5. Záver

Ceramidy patriace do veľkej skupiny sfingolipidov, zastupujú esenciálnu funkciu v biológii každej eukaryotickej bunky. Okrem ich intracelulárnych funkcií sa ceramidy podieľajú na extracelulárnych reguláciách v nervovom systéme a ľudskej koži. V najvrchnejšej vrstve epidermis, *stratum corneum*, ceramidy spolu s voľnými masnými kyselinami, cholesterolom a cholesterol-sulfátom vytvárajú intercelulárnu lipidovú matrix, ktorá zabezpečuje bariérové vlastnosti kože. K dnešnému dňu je známych vyše 12 podtried ceramidov. Koža patrí medzi orgány s najväčším obsahom a najvyššou členitosťou ceramidov. Dôvody pre túto vysokú rozmanitosť v ľudskej koži doteraz nie sú úplne pochopené a sú predmetom intenzívneho štúdia.

Okrem Ceramidov odvodených od sfingozínu, dihydrosfingozínu, fytosfingozínu sa v ľudskej epidermis nachádza aj veľké množstvo ceramidov odvodených od 6-hydroxysfingozínu, 6-hydroxyceramidov. Táto skupina bola doposiaľ pozorovaná iba v ľudskej epidermis. Najväčším problémom v štúdiu týchto lipidov je ich komerčná nedostupnosť a veľmi náročná, mnohokroková syntéza. Preto prvým cieľom tejto práce bol popis novej kratšej syntetickej cesty k 6-hydroxysfingozínu a jeho izolácia. Stratégiou syntézy bola reakcia racemického alkynolu s komerčne dostupným (*S*)-Garnerovým aldehydom (chráneným *L*-Serinalom) a teda v obídení náročnej a zdĺhavej lipázovej reakcie, ktorá bola použitá v predošlých publikovaných syntézach. Ďalším zásadným krokom v syntéze 6-hydroxysfingozínu bola redukcia trojitej väzby na *trans*-dvojitú pomocou *trans*-selektívnej Trostovej hydrosilylácie s následnou protodesilyláciou. Celá syntéza bola optimalizovaná až bol pripravený 6-hydroxysfingozín, v siedmych reakčných krokoch, s celkovým výťažkom 40 %. Táto práca predstavuje novú, kratšiu a jednoduchšiu syntetickú cestu k 6-hydroxysfingozínu. Izolovaný 6-hydroxysfingozín bol použitý na ďalšie biochemické a biofyzikálne štúdium.

Ďalším cieľom bolo využitie takto synteticky pripravenej sfingoídnej bázy na syntézu všetkých 6-hydroxyceramidov. V tejto práci je predstavená príprava troch 6-hydroxyceramidov. CerNH a Cer NH-d₄₇ (ceramid s deuterovanou masnou kyselinou) boli pripravené reakciou s H s výťažkami 90 % a 95 %. Ďalej bola komentovaná príprava neznámeho diastereoméru CerAH. Diastereoselektívna syntéza CerAH nebola úspešná a bude predmetom ďalšieho štúdia.

Posledným cieľom tejto práce bol popis vplyvu CerNH na biofyzikálne vlastnosti modelových lipidových membrán. Tieto membrány predstavujú zjednodušený model intercelulárnej lipidovej matrix *stratum corneum*. Biofyzikálne vlastnosti membrán obsahujúcich CerNH boli hodnotené pomocou ATR-FTIR. Takto bolo popísané tesné orthorhombické usporiadanie lipidov v daných membránach. Ďalej bola popísaná fázová separácia a tvorba tesných orthorhombických domén voľných mastných kyselín v prítomnosti CerNH. Okrem toho boli namerané rozdielne teploty fázových prechodov CerNH a voľných mastných kyselín a v neposlednom rade nižší stupeň usporiadania molekúl CerNH v modelových lipidových membránach. Tieto dáta prispievajú k popisu biofyzikálnej podstaty intercelulárnej lipidovej matrix *stratum corneum* a vplyvu jednotlivých lipidov na jej funkciu a stavbu.

Napriek tomu, že všetky počiatočné ciele tejto práce boli naplnené táto práca otvorila niekoľko nových otázok ohľadom reaktivity, totálnej syntézy a fyziologickej funkcie 6-hydroxyceramidov v ľudskej koži. Nakoniec je treba dodať, že všetky pripravené látky a výsledky budú predmetom ďalšieho štúdia a svojou časťou prispievajú k lepšiemu porozumeniu významu epidermálnych lipidov v ľudskej fyziológii.

6. Zoznam skratiek

AD-mix-β zmes $K_2OsO_2(OH)_4$, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3 , hydrochinidin-1,4-ftalazindiyl-diether

ATR-FTIR infračervená spektroskopia zoslabeného odrazu spojená s Fourierovou transformáciou

Boc *tert*-butyloxykarbonyl

n-BuLi n-butyllithium

***tert*-BuLi** *tert*-butylyllithium

CA cerebrónová kyselina

Cer ceramid(y)

H-Cer 6-hydroxyceramidy

fytoCer fytoceramidy

(S)-GA Garnerov aldehyd, (*S*)-*tert*-butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát

GlcCer glucosylované ceramidy

DCM dichlormethan

(-)-DET (*S/S*)-diethyltartarát

DIBAL diisobutylaluminiumhydrid

DMAP 4-dimethylaminopyridin

DMF dimethylformamid

DMP 2,2-dimethoxypropan

e.e. prebytok enantioméru (z anglického enatiomeric excess)

EDC 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

FFA voľné mastné kyseliny (voľná mastná kyselina)

H 6-hydroxysfingoín

HMPA hexamethylfosforamid

HOBt 1-hydroxybenzotriazol

Chol cholesterol

CholS cholesterol sulfát

IR infračervená(é), infračervená spektroskopia

LC/MS kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou

LIG lignocerová kyselina

***d*-LIG** deuterovaná lignocerová kyselina (*d*₄₇)

MS hmotnostná spektrometria

NCS *N*-chlorsukcinimid

NMR nukleárna magnetická rezonancia

Ref. referencia

R_f retenčný factor

r.t. laboratórna teplota

SC stratum corneum

S sfingoín

dS dihydrosfingoín

SL sfingolipid(y)

SM sfingomyelín(y)

TBHP *tert*-butylhydroperoxid

TBSCl *tert*-butyldimethylsilyl-chlorid

TFA trifluoroctová kyselina

THF tetrahydrofuran

TLC tenkovrstevná chromatografia

TBS *tert*-butyldimethylsilyl

TMS trimethylsilyl

7. Použitá literatura

1. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150 (2008).
2. Holleran, W. M., Takagi, Y., & Uchida, Y. Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett.* **580**(23), 5456–5466 (2006).
3. García-Arribas, A. B., Alonso, A. & Goñi, F. M. Cholesterol interactions with ceramide and sphingomyelin. *Chem. Phys. Lipids* **199**, 26–34 (2016).
4. van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G. S. & Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 295–313 (2014).
5. Rabionet, M., Gorgas, K. & Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 422–434 (2014).
6. Kováčik, A., Roh, J. & Vávrová, K. The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family. *ChemBioChem* **15**, 1555–1562 (2014).
7. Čihák R. Anatomie 3. 1 ed.; Grada: Praha, 1997.
8. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* **12**(4), 390-401 (2002).
9. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin. Dermatol.* **32**(1), 3-13 (2014).
10. Zomer, H. D. & Trentin, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J. Dermatol. Sci.* **90**, 3–12 (2018).
11. Wysocki, A. B. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs. Clin. North Am.* **34**, 777—97, v (1999).
12. Brody I. The ultrastructure of the horny layer in normal and psoriatic epidermis as revealed by electron microscopy. *J Invest Dermatol.* **39**, 519-528 (1962).
13. Alibardi L. Adaptation to the land: The skin of reptiles in comparison to that of amphibians and endotherm amniotes. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* **298**(1), 12-41 (2003).
14. Matsui, T. & Amagai, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int. Immunol.* **27**, 269–280 (2015).
15. Tagami, H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**, 413–434 (2008).
16. Ya-Xian, Z., Suetake, T. & Tagami, H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch. Dermatol. Res.* **291**, 555–559 (1999).
17. Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* **31**(1), 5-19 (1999).

18. van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Curr. Probl. Dermatol.* **49**, 8-26 (2016).
19. Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci.* **107**(Pt 2), 693-700 (1994).
20. Elias, P. M., Gruber, R., Crumrine, D., Menon, G., Williams, M. L., Wakefield, J. S., Holleran, W. M., & Uchida, Y. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**(3), 314-318 (2014).
21. Zheng, Y., Yin, H., Boeglin, W. E., Elias, P. M., Crumrine, D., Beier, D. R., & Brash, A. R. Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J. Biol. Chem.* **286**(27), 24046-24056 (2011).
22. Tonicic, R. J., Jakasa, I., Hadzavdic, S. L., Goorden, S. M., Vlugt, K., Stet, F. S., Balic, A., Petkovic, M., Pavicic, B., Zuzul, K., Marinovic, B., & Kezic, S. Altered Levels of Sphingosine, Sphinganine and Their Ceramides in Atopic Dermatitis Are Related to Skin Barrier Function, Disease Severity and Local Cytokine Milieu. *Int J Mol Sci.* **21**(6), 1958 (2020).
23. Boncheva, M. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *Int. J. Cosmet. Sci.* **36**, 505–515 (2014).
24. Landmann, L. Epidermal permeability barrier: Transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J Invest Dermatol.* **87**, 202–209 (1986).
25. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., van der Spek, J. A. & Bras, W. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol.* **97**, 1005–1012 (1991).
26. Hill, J. R. & Wertz, P. W. Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1616**, 121–126 (2003).
27. Norlén, L. Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 830–836 (2001).
28. Damien, F. & Boncheva, M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 611–614 (2010).
29. Laugel, C., Yagoubi, N. & Baillet, A. ATR-FTIR spectroscopy: A chemometric approach for studying the lipid organisation of the stratum corneum. *Chem. Phys. Lipids* **135**, 55–68 (2005).
30. Hannun Y. A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science.* **274**(5294), 1855–1859 (1996).
31. Olsen, Anne S B, and Nils J Færgeman. Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol.* **7**, 5 170069 (2017).
- 32 Borodzicz, S., Rudnicka, L., Mirowska-Guzel, D., & Cudnoch-Jedrzejewska, A. The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids Health Dis.* **15**, 13 (2016).
33. Cha, H. J., He, C., Zhao, H., Dong, Y., An, I. S., & An, S. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int. J. Mol. Med.*, **38**(1), 16–22 (2016).

34. Coderch, L., López, O., De La Maza, A. & Parra, J. L. Ceramides and skin function. *Am. J. Clin. Dermatol.* **4**, 107–129 (2003).
35. Yamamoto, H., Hattori, M., Chamulitrat, W., Ohno, Y. & Kihara, A. Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene FATP4 through formation of the barrier lipid ω -O-acylceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 2914–2922 (2020).
36. Rabionet, M., Bayerle, A., Marsching, C., Jennemann, R., Gröne, H. J., Yildiz, Y., Wachten, D., Shaw, W., Shayman, J. A., & Sandhoff, R. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J. Lipid Res.* **54**(12), 3312–3321 (2013).
37. Breiden, B. & Sandhoff, K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeabilitybarrier formation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 441–452 (2014).
38. Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., & Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta*, **1182**(2), 147–151 (1993).
39. Robson, K. J., Stewart, M. E., Michelsen, S., Lazo, N. D. & Downing, D. T. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.* **35**, 2060–2068 (1994).
40. Opálka, L., Kováčik, A., Sochorová, M., Roh, J., Kuneš, J., Lenčo, J., & Vávrová, K. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org. Lett.* **17**(21), 5456–5459 (2015).
41. Othman, A., Rütli, M. F., Ernst, D., Saely, C. H., Rein, P., Drexel, H., Porretta-Serapiglia, C., Lauria, G., Bianchi, R., von Eckardstein, A., & Hornemann, T. Plasma deoxysphingolipids: a novel class of biomarkers for the metabolic syndrome?. *Diabetologia*, **55**(2), 421–431 (2012).
42. Lowther, J., Naismith, J. H., Dunn, T. M. & Campopiano, D. J. Structural, mechanistic and regulatory studies of serine palmitoyltransferase. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 547–554 (2012).
43. Fornarotto, M., Xiao, L., Hou, Y., Koch, K., Chang E., O'Malley, R., Black, T., Cable, M. & Walker, S. Sphingolipid biosynthesis in pathogenic fungi: Identification and characterization of the 3-ketosphinganine reductase activity of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 52–63 (2006).
44. Mullen, T. D., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* **441**, 789–802 (2012).
45. Laviad, E. L., Albee, L., Pankova-Kholmyansky, I., Epstein, S., Park, H., Merrill, A. H., Jr, & Futerman, A. H. Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **283**(9), 5677–5684 (2008)..
46. Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S. & Futerman, A. H. When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 25001–25005 (2006).
47. Savile, C. K., Fabriàs, G. & Buist, P. H. Dihydroceramide Δ 4 desaturase initiates substrate oxidation at C-4. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4382–4385 (2001).
48. Michel, C., van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., & Merrill, A. H., Jr. Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **272**(36), 22432–22437 (1997).

49. Gault, C. R., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. An overview of sphingolipid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**, 1–23 (2010).
50. Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J. & Hannun, Y. A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* **20**, 1010–1018 (2008).
51. Marchesini, N. & Hannun, Y. A. Acid and neutral sphingomyelinases: Roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 27–44 (2004).
52. Saito, M. & Saito, M. Involvement of sphingolipids in ethanol neurotoxicity in the developing brain. *Brain Sci.* **3**, 670–703 (2013).
53. Akiyama M., Sugiyama-Nakagiri Y, Sakai K, McMillan JR, Goto M, Arita K, Tsuji-Abe Y, Tabata N, Matsuoka K, Sasaki R & Sawamura D, S. H. Mutations in ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional rescue by corrective gene transfer. *J. Clin. Invest.* **115**(7), 1777–84 (2005).
54. Hamanaka, S., Asagami, C., Kobayashi, K., Ishibashi, Y. & Otsuka, F. Sphingoglycolipids in human cultured keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **282**, 345–347 (1990).
55. Wakita, H., Nishimura, K., & Takigawa, M. Composition of free long-chain (sphingoid) bases in stratum corneum of normal and pathologic human skin conditions. *J. Invest. Dermatol.*, **99**(5), 617–622 (1992).
56. Stewart, M. E. & Downing, D. T. A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J. Lipid Res.* **40**, 1434–1439 (1999).
57. Bleck, O., Abeck, D., Ring, J., Hoppe, U., Vietzke, J. P., Wolber, R., Brandt, O., & Schreiner, V. Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.*, **113**(6), 894–900 (1999).
58. Mori, K. & Masuda, Y. Synthesis and stereochemistry of ceramide B, (2S,3R,4E,6R)-N-(30-hydroxytriacontanoyl)-6-hydroxy-4-sphingenine, a new ceramide in human epidermis. *Tetrahedron Lett.* **44**, 9197–9200 (2003).
59. Masuda, Y. & Mori, K. Synthesis and absolute configuration of 6-hydroxylated new ceramides in human skin, ceramides B, 4, 7 and 8. *Eur. J. Org. Chem.* 4789–4800 (2005)
60. Choi, M. J. & Maibach, H. I. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am. J. Clin. Dermatol.* **6**, 215–223 (2005).
61. Schreiner, V., Gooris, G. S., Pfeiffer, S., Lanzendörfer, G., Wenck, H., Diembeck, W., Proksch, E., & Bouwstra, J. Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J. Invest. Dermatol.*, **114**(4), 654–660 (2000).
62. Macheleidt, O., Kaiser, H. W. & Sandhoff, K. Deficiency of epidermal protein-bound ω -hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 166–173 (2002).
63. Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Kezic, S., Lavrijsen, A. P., & Bouwstra, J. A. Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* **131**(10), 2136–2138 (2011).
64. 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. *J. Lip. Res.*, **53**(12), 2755–2766 (2012).

65. Imokawa, G. A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: Expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *J. Dermatol. Sci.* **55**, 1–9 (2009).

66. Liew, S. K., Kaldas, S. J. & Yudin, A. K. A Linchpin Synthesis of 6-Hydroxyceramides from Aziridine Aldehydes. *Org. Lett.* **18**, 6268–6271 (2016).

67. Wisse, P., de Geus, M. A., Cross, G., van den Nieuwendijk, A. M., van Rooden, E. J., van den Berg, R. J., Aerts, J. M., van der Marel, G. A., Codée, J. D., & Overkleeft, H. S. Synthesis of 6-Hydroxysphingosine and α -Hydroxy Ceramide Using a Cross-Metathesis Strategy. *J. Org. Chem.* **80**(14), 7258–7265 (2015).

68. Yadav, J. S., Geetha, V., Raju, A. K., Gnaneshwar, D. & Chandrasekhar, S. The first total synthesis of the 6-hydroxy-4E-sphingenes. *Tetrahedron Lett.* **44**, 2983–2985 (2003).

69. Chun, J., Byun, H. S. & Bittman, R. First asymmetric synthesis of 6-hydroxy-4-sphingene-containing ceramides. Use of chiral propargylic alcohols to prepare a lipid found in human skin. *J. Org. Chem.* **68**, 348–354 (2003).

70. Kováčik, A., Opálka, L., Šilarová, M., Roh, J. & Vávrová, K. Synthesis of 6-hydroxyceramide using ruthenium-catalyzed hydrosilylation-protodesilylation. Unexpected formation of a long periodicity lamellar phase in skin lipid membranes. *RSC Adv.* **6**, 73343–73350 (2016).

71. Sikorski, W. H. & Reich, H. J. The regioselectivity of addition of organolithium reagents to enones and enals: The role of HMPA. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6527–6535 (2001).

72. Reetz, M. T., Hüllmann, M. & Seitz, T. The First Direct Evidence for a Cram Chelate. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **26**, 477–479 (1987).

73. Houk, K. N. Perspective on ‘Theoretical interpretation of 1-2 asymmetric induction. The importance of antiperiplanarity’. *Theor. Chem. Acc.* **103**, 330–331 (2000).

74. Yang, Y. F., Chung, L. W., Zhang, X., Houk, K. N. & Wu, Y. D. Ligand-controlled reactivity, selectivity, and mechanism of cationic ruthenium-catalyzed hydrosilylations of alkynes, ketones, and nitriles: A theoretical study. *J. Org. Chem.* **79**, 8856–8864 (2014).

75. Trost, B. M. & Ball, Z. T. Alkyne hydrosilylation catalyzed by a cationic ruthenium complex: Efficient and general trans addition. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17644–17655 (2005).

76. Putzig, C. L., Leugers, M. A., McKelvy, M. L., Mitchell, G. E., Nyquist, R. A., Papenfuss, R. R., & Yurga, L. Infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* **66**(12), 26R–66R (1994).

77. Mendelsohn, R. & Moore, D. J. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids.* **96**, 141–157 (1998).

78. Kováčik, A., Šilarová, M., Pullmannová, P., Maixner, J. & Vávrová, K. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir.* **33**, 2890–2899 (2017).

79. Kováčik, A., Vogel, A., Adler, J., Pullmannová, P., Vávrová, K., & Huster, D. Probing the role of ceramide hydroxylation in skin barrier lipid models by ^2H solid-state NMR spectroscopy and X-ray powder diffraction. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1860**(5), 1162–1170 (2018).