Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Syntéza acylceramidů modifikovaných na jejich linoleátové části

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lukáš Opálka, PhD.

Konzultantky: MSc. Sorina Hirbod, MSc. Panagiota Velissari

Hradec Králové 2024 Isabela Whelanová

Abstrakt

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

Kandidátka: Isabela Whelanová
Školitel: PharmDr. Lukáš Opálka, PhD.
Konzultantky: MSc. Sorina Hirbod, MSc. Panagiota Velissari
Název diplomové práce: Syntéza acylceramidů modifikovaných na jejich linoleátové části

Acylceramidy (ceramidy ω-*O*-acylované linolovou kyselinou) jsou skupina lipidů ve *stratum corneum*, která hraje významnou roli v tvorbě bariérové funkce kůže. Mohou být volné, kde hrají zásadní roli pro vznik intercelulárních lipidových lamel, nebo kovalentně vázané na povrch korneocytu, kde tvoří strukturu zvanou korneocytární lipidová obálka (CLE). CLE vzniká oxidací linoleátu na epoxy-enon, který poté reaguje s proteiny na povrchu korneocytu. Předpokládá se, že dochází k Michaelově adici, ale přesný mechanismus stále není znám.

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit modelový epoxidovaný acylceramid, a to pomocí metody, která by vycházela z prekurzoru acylceramidu, na který by bylo možné selektivně navázat jakoukoliv mastnou kyselinu do ω-polohy. Modelový epoxidovaný acylceramid bude dále využit pro zkoumání mechanismu vzniku CLE.

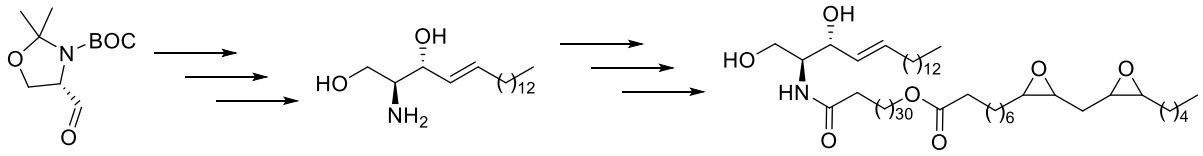


Schéma 1: Syntéza oxidovaného acylceramidu

Jako první byl dvoukrokovou syntézou připraven sfingosin z Garnerova aldehydu. Poté byl sfngosin *N*-acylován reakcí s aktivovanou mastnou kyselinou, jejíž OH-skupina byla chráněna. OH-skupiny sfingosinu byly ochráněny jinou chránící skupinou a OH-skupina mastné kyseliny naopak odchráněna, aby mohl ceramid být acylován. V posledním kroku byly odchráněny veškeré chránící skupiny za vzniku specificky oxidovaného acylceramidu. [schéma 1]

Klíčová slova: acylceramidy, korneocytální lipidová obálka, epoxidovaná linolová kyselina

Abstract

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Organic and Bioorganic chemistry
Candidate: Isabela Whelanová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Opálka, PhD.
Consultants: MSc. Sorina Hirbod, MSc. Panagiota Velissari
Title of diploma thesis: Synthesis of acylceramides modified on their linoleate part

Acylceramides (ceramides ω-*O*-acylated with linoleic acid) are a group of lipids present in the *stratum corneum* of the skin, where they play an important role in barrier formation. They can be found either in a free form, where they play an important role in forming intercellular lipid lamellae, or covalently attached to the surface of corneocytes providing a structure called corneocyte lipid envelope (CLE). The CLE biosynthesis is based on the oxidation of linoleate moiety to an epoxy enon, which then reacts with the protein coat of corneocytes, probably by a mechanism of Michael reaction, but the exact mechanism remains unclear.

The goal of this thesis was to synthesize a model epoxidized acylceramide using a method based on an acylceramide precursor, that could be selectively ω-acylated by any fatty acid. The model epoxidized acylceramide will be used to study the mechanism of CLE formation.

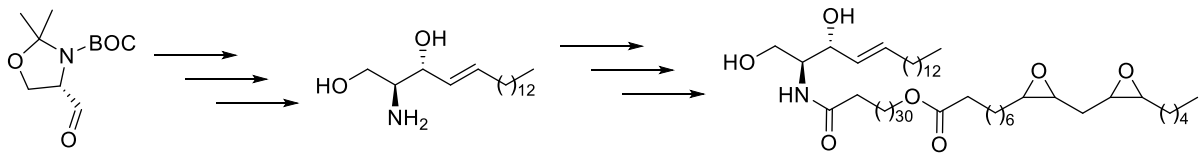


Schéma 2: Synthesis of oxidized acylceramide

In the first step of the process, sphingosine was synthesized from Garner's aldehyde in a two-step reaction. Next, a ceramide was prepared by an *N*-acylation reaction of sphingosine with the activated fatty acid, whose OH-group was protected. OH-groups of the sphingosine were protected by a different protective group and the OH-group of the fatty acid was deprotected, to allow for the ceramide to be acylated with either linoleic acid or its oxidized form. In the

last step, all the remaining protective groups were removed to provide the desired molecule of a specifically oxidized acylceramide [schéma 2].

Keyywords: acylceramides, corneocyte lipid envelope, epoxidized linoleic acid

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli PharmDr. Lukáši Opálkovi, PhD., a mým konzultantkám MSc. Panagiotě Velissari a MSc. Sorině Hirbod, kteří mi věnovali neuvěřitelné množství času a podpory. Také bych chtěla poděkovat i celé Skin Barrier Research Group.

Také bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za měření NMR spekter.

V neposlední řadě patří mé poděkování i Grantové agentuře České republiky, která tento projekt podpořila (22-20839K).

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne Isabela Whelanová

Obsah

Abstrakt 2
Abstract 3
Poděkování 5
Prohlášení 6
Obsah 7
Úvod a cíl práce 9
Teoretická část 10
Struktura kůže 10
Struktura *stratum corneum* 11
Korneocytární obálka a korneocytární lipidová obálka 12
Struktura ceramidu 13
Biosyntéza acylceramidů 14
Biosyntéza ultradlouhé MK 14
Biosyntéza sfingoidní báze 16
Lamelární granula 17
Vznik CLE 18
Lipidové lamely 20
Laterální uspořádání intercelulárních lipidů 21
Patologické změny ceramidů 21
Syntéza sfingosinu, ceramidů a acylceramidů 22
Diskuze a výsledky 26
Syntéza sfingosinu 26
Metoda chránění sfingosinu v podobě trimethylsilyletheru 26
Metoda chránění silylací MK 27

Syntéza acylceramidu s linolovou kyselinou 28
Syntéza epoxidovaného ceramidu 29
Metoda chránění acetylací MK 31
Experimentální část 32
Chemikálie a přístroje 32
Syntéza sfingosinu 33
Syntéza prekurzoru acylceramidu přes chránění aktivované MK pomocí *terc*-butyldimethylsilylové skupiny 36
Syntéza acylceramidu s linolovou kyselinou 40
Syntéza ceramidu s epoxidovanou linolovou kyselinou 42
Syntéza prekurzoru acylceramidu pomocí chránění aktivované MK acetylací 47
Závěr 48
Zkratky 49
Zdroje 50

Úvod a cíl práce

Korneocytární lipidová obálka (CLE) je struktura tvořená z ceramidů ω-*O*-acylovaných linolovou kyselinou (acylceramidů), které se váží na proteiny na povrchu korneocytu (bezjaderných buněk v nejsvrchnější části epidermis, zvané *stratum corneum*). Kolem CLE stále zůstává mnoho nezodpovězených otázek. Není zcela jasné, jakou přesně má funkci, ani to, jak přesně vzniká. Dlouho se předpokládalo, že dochází k transesterifikaci oxidované (epoxy-enon) linoleátové části řetězce. V roce 2020 Takeichi et. al. formulovali novou hypotézu, dle které se acylceramid váže přímo přes epoxy-enon linoleátové části na proteiny na povrchu korneocytu, a to pravděpodobně mechanismem Michaelovy adice. Přesný mechanismus však není znám.

Cílem práce bylo vytvořit modelový epoxidovaný acylceramid. Tento modelový acylceramid bylo v plánu v rámci Skin Barrier Research Group (nad rámec této práce) využít jak pro zkoumání mechanismu vzniku CLE, tak jako předloha metody pro syntézu fyziologického epoxy-enonovaného acylceramidu. Dílčím cílem bylo vyzkoušet metody, pomocí kterých lze vytvořit prekurzor acylceramidu, který by bylo možné selektivně acylovat na ω-hydroxyskupině a porovnat mezi sebou tyto metody. Prekurzor acylceramidu bylo plánováno nejprve otestován syntézou za vzniku neepoxydovaného (fyziologického) acylceramidu, který by sloužil jako model pro optimalizaci podmínek před syntézou samotného epoxidovaného acylceramidu. Jako další dílčí cíl byla vytyčena syntéza sfingosinu ve velkém množství, který by byl použit pro účely této práce i pro jiné projekty v rámci Skin Barrier Research Group.

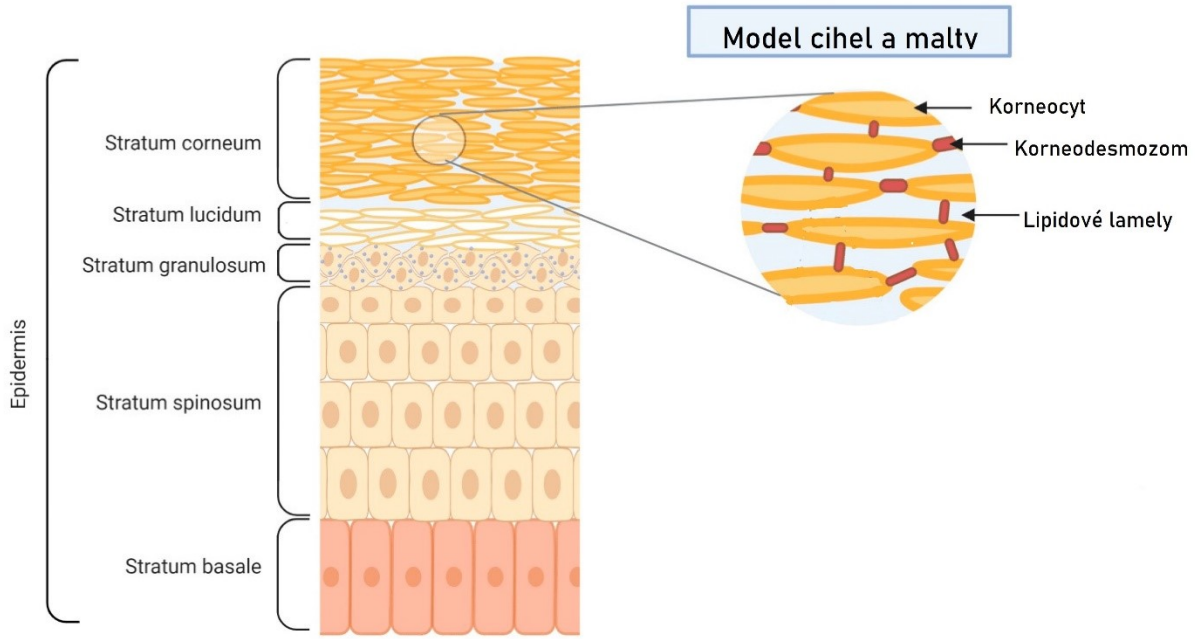
Teoretická část

Kůže je největší orgán v našem těle (*1*) s průměrnou plochou 2 m^2 (*2*). Hlavní funkcí kůže je tvořit bariéru chránící před vnějším prostředím a před ztrátami vody (*3*).

Struktura kůže

Dermis je nejtlustší část kůže (3-5 mm), skládá se z fibroblastů a intercelulární hmoty z kolagenu a elastinu. Pod ní se nachází tukovitá hypodermis (*1*). Nad dermis se nachází epidermis, nejsvrchnější vrstva kůže (*1, 4, 5*). Je rozdělená do čtyř částí. Nejspodnější vrstvou je *stratum basale*. Nad ním se nachází *stratum spinosum*, *stratum granulosm* a zcela na na vrchu epidermis se nachází *stratum corneum* (*1, 4, 5*). Na dlaních a chodidlech se mezi *stratum granulosum* a *stratum corneum* nachází *stratum lucidum* (*6*). [obrázek 1]

Stratum basale je tvořena hlavně vrstvou buněk, zvaných bazální buňky, které se neustále dělí a tvoří tak keratinocyty, které prostupují do vyšších vrstev epidermis (*5-7*). Při prostupu do svrchnějších vrstev se diferencují až na zploštělé plně diferenciované korneocyty, které se nachází ve *stratum corneum* (*1, 4, 5*). Ve *stratum spinosum* začíná diferenciace keratinocytů (*8*), dochází ke zpevnění jejich cytoskeletu, což zvyšuje odolnost proti mechanickému poškození (*9*). Také zde začíná syntéza specifických epidermálních lipidů (*7*). Ve *stratum granulosum* diferenciace pokračuje (*8*). Vznikají svazky keratinu a filaggrinu a tvoří se specifické organely zvané lamelární granula, které jsou naplněné lipidy (*5*). Terminální diferenciace na korneocyt je proces buněčné smrti zahrnující zploštění buňky, ztrátu DNA a jádra (*10*) a vznik kornifikované obálky (*7, 8*) a korneocytární lipidové obálky (*7*). Úplně na povrchu kůže dochází k deskvamaci, což je proces, při kterém se sloupávají horní vrstvy korneocytů (*5, 8, 11*).



Obrázek 1: Struktura epidermis a stratum corneum (12)

Struktura *stratum corneum*

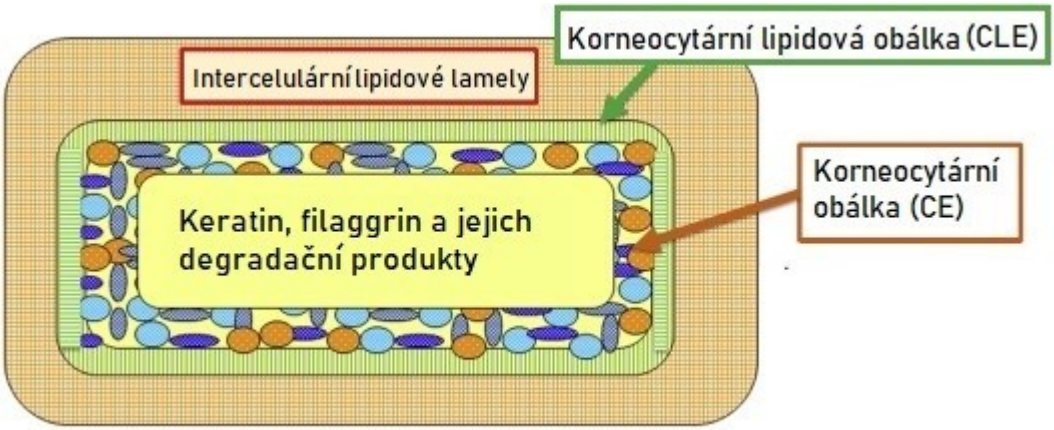
Stratum corneum (dále SC) je hlavním nosičem bariérové funkce kůže (*1, 8, 13*). Bariérovou funkcí označujeme nejen schopnost kůže bránit průchodu látek z prostředí skrz kůži (*13, 14*), ale také snižování ztráty vody z organismu na minimum (*3, 8, 13, 14*). Bariéru tvoří kůže hlavně díky lipidům ve SC (*8, 13*).

SC sestává z korneocytů, intercelulárních lipidových lamel i korneodesmozomů (modifikovaných desmozomů typických pro SC, které umožňují mezibuněčnou adhezi) (*1, 11*). Většinu hmotnosti SC (75–80 %) tvoří proteiny koncentrované v 15–25 vrstvách korneocytů, lipidy tvoří 5–15 % hmotnosti (*4, 15*). Korneocyty jsou vyplněné vodou a keratinem (*16*). Mastné kyseliny (MK), ceramidy a cholesterol jsou typickými lipidy pro SC a nachází se zde v molárním poměru přibližně 1:1:1 (*7, 17, 18*). Hmotnostně vyjdou ceramidy na 45–50 % všech lipidů (*8, 13, 19, 20*), cholesterol na 25 %, volné MK 10–15 % a zbytek jsou jiné lipidy (*8, 13*).

Tato struktura korneocytů obklopených lipidovými lamelami se často připodobňuje k cihlové zdi (brick and mortar structure), kde korneocyty jsou cihly, které jsou obklopené „maltou“ z lipidů [obrázek 1] (*1, 4, 12, 16, 20, 21*). Limitací tohoto přirovnání je, že nezobrazuje flexibilitu a přizpůsobivost SC (*10*).

Korneocytární obálka a korneocytární lipidová obálka

Kornifikovaná membrána nahrazuje cytoplazmatickou membránu korneocytu. Tato membrána se nazývá korneocytární obálka (CE) [Obrázek 2]. Poskytuje nejen mechanickou bariéru, ale je i oporou (scaffold) pro lipidové lamely (*23, 24*). Kalcium-dependentní transglutaminázy (TGM) katalyzují vznik *N*(ε)-(γ-glutamyl)lysin isopeptidové vazby, které provazují (crosslinking) proteiny CE (involukrin, lorikrin, filaggrin, desmozomální proteiny) (*15, 23*).



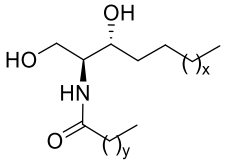
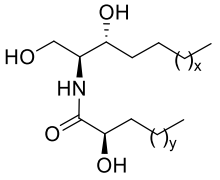
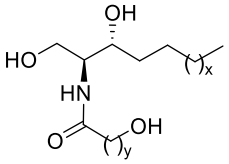
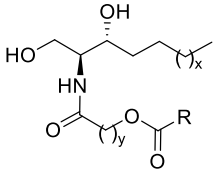
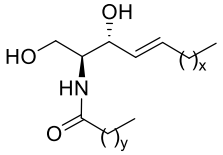
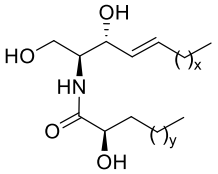
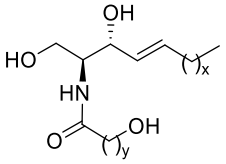
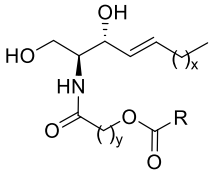
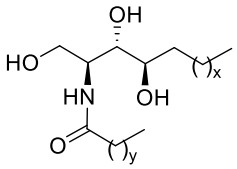
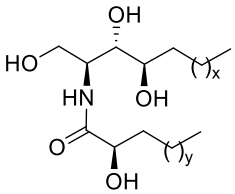
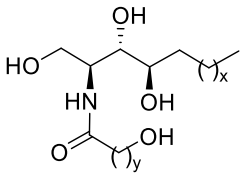
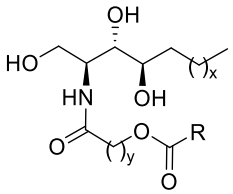
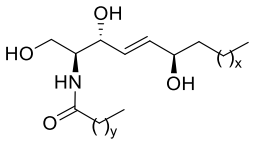
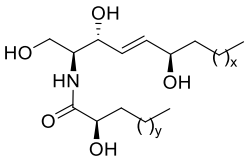
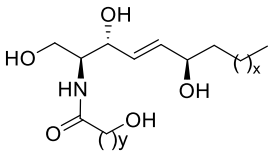
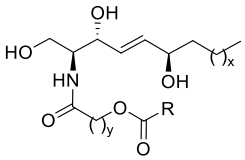
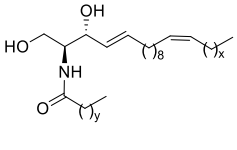
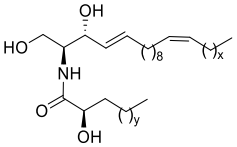
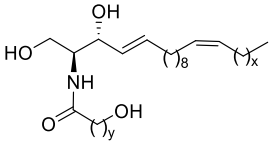
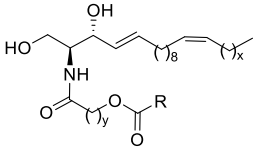
Obrázek 2: Korneocytární obálka a korneocytární lipidová obálka (22)

Korneocytární lipidová obálka (CLE) je monovrstva lipidů, která se kovalentně váže na CE a pokrývá celý povrch korneocytů [Obrázek 2]. CLE je tvořena převážně z ceramidů s ultra dlouhým řetězcem, ale nachází se v ní i mastné kyseliny s ultra dlouhým řetězcem. (*22, 25*).

Funkce CLE ještě není zcela objasněná (*24*). Jednou z hypotéz je, že CLE slouží jako opora pro tvorbu lipidových lamel (*15, 16, 24, 25*). Nově bylo in vitro ukázáno, že CLE napomáhá fluidizaci lipidů SC, což umožňuje správné skládání lipidových lamel (*26*). CLE také tvoří rozhraní mezi hydrofilními korneocyty a lipofilním prostředím SC (*1, 27*), a může zabraňovat úniku hydrofilních látek ven z korneocytů (*25, 27*), případně průniku do nich (*16, 27*). Také by mohla mít roli na udržování koheze SC (*25, 27*).

Struktura ceramidu

Tabulka 1: Strukturní typy ceramidů

	Nehydroxylované	α-hydroxylované	ω-hydroxylované	ω-*O*-acylované
[DS]				
[S]				
[P]				
[H]				
[D]				

Ceramidy obsahují sfingosin či jeho derivát, označované jako LCB (long-chain base) (*2, 28*), na který je amidicky navázána mastná kyselina (*18, 29*). Původně bylo v kůži popsáno 5 strukturních typů ceramidů, dnes už jich známe přes 20 (*4, 7, 30*). Pro označování strukturních typů ceramidů se užívá specifická nomenklatura, která vychází z Motta et al., 1993 (*18, 31*). V této nomenklatuře první písmeno (nebo dvě) značí typ MK *(N = nehydroxylovaná, A = α-hydroxylovaná, EO= ω-O-acylovaná (tj. acylceramidy), O = ω-hydroxylovaná (7, 28, 29))* a další písmeno či dvě značí typ LCB *(DS = dihydrosfingosin, S = sfingosin, P = fytosfingosin*

(tj. 4-hydroxydihydrosfingosin), H = 6-hydroxysfingosin (28, 29), SD = 4,14-sfingadien) (7, 28)). [tabulka 1]

Ve tkáních mimo kůži se nachází především CER[NS], celkově je obsah ceramidů ve tkáních mimo SC nízký (*28*). MK kožních ceramidů je typicky nasycená a obsahuje 18–32 C (*18*), s tím, že MK C28+ se nachází pouze v kůži (*32*). Zajímavé je, že ceramidy typu CER[O*], CER[EO*] a CER[P-O*] obsahují ultradlouhé MK (C28+, hlavně C30 a C32), zatímco ostatní typy obsahují kratší MK (hlavně C24 a C26) (*2, 28*). Většina ultradlouhých MK v acylceramidech je nenasycených (*27, 33*). Různou délku řetězce mohou mít i LCB, byly popsány v rozmezí C16-26 (*28*). CER[EO*] nejčastěji obsahují navázanou linolovou kyselinu (*34*).

Specifickou kategorií jsou ceramidy vázané na proteiny, které se označují jako P-O (*28*) nebo PB- (*30*). (poznámka: tyto ceramidy analyzujeme tak, že po důkladném promytí vzorku SC, které zajistí odstranění všech volných ceramidů, alkalicky hydrolyzujeme vazbu ceramidu na protein – to vysvětluje, proč se označují CER[P-O*] a nikoliv CER[P-EO*] jak bychom mohli čekat na základě současné hypotézy vzniku CLE popsané v pozdějších kapitolách). Mohou být odvozené od jakéhokoliv typů LCB, ale nejzastoupenější jsou CER[P-OS] (82,3 %) a CER[P-OH] (15,2 %) (*28*).

Biosyntéza acylceramidů

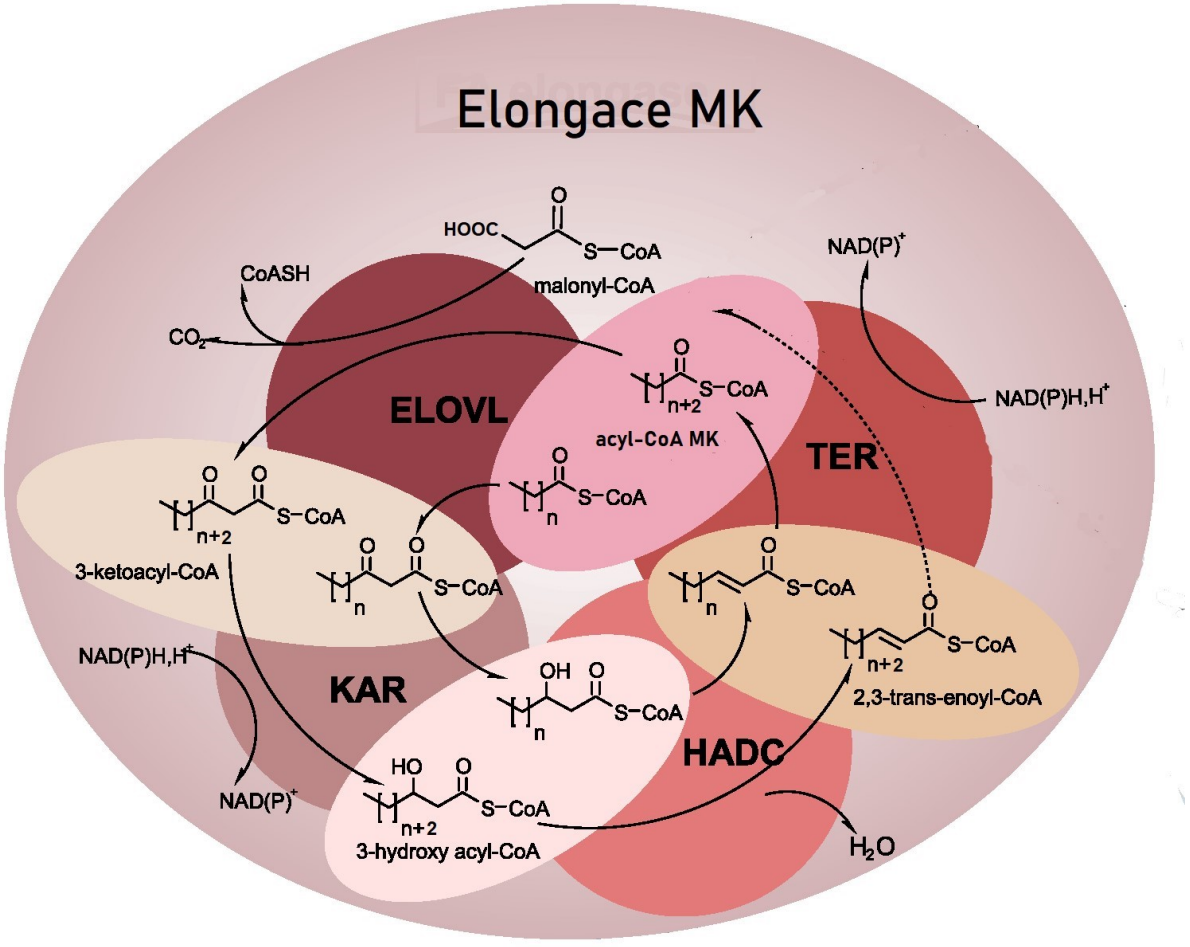
Lipidy kožní bariéry jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a následné modifikace v Golgiho aparátu, odkud se posouvají do lamelárních granul (*17, 35, 36*).

Biosyntéza ultradlouhé MK

Hranice, od které se MK považují za ultradlouhé, je poněkud sporná. Některé zdroje uvádějí od C26 (*6*), jiné až od C30 (*37*). Pro nás jsou tyto MK důležité z hlediska jejich výskytu v acylceramidech, u kterých se nachází MK delší než C28 (*28*). Při elongaci řetězce se vychází z palmitoyl-CoA, na který se navazuje malonyl-CoA (*9, 22, 27*). První krok (kondenzaci) v procesu elongace zajišťují elongázy (ELOVL) (*9, 22*). ELOVL se nachází v endoplazmatickém retikulu (*27*). U člověka existují ELOVL1-7, z nichž každá je tkáňově i substrátově specifická (*9, 27*). V procesu tvorby mastných kyselin do budoucích

acylceramidů jsou zahrnuty ELOVL6, ELOVL3 a ELOVL1 a finální ELOVL4 (*22, 27*), která elonguje mastné kyseliny s délkou nad C26 (*9, 27*). Při deficienci ELOVL4 dochází k nedostatku MK s ultradlouhým řetězcem i acylceramidů (*3, 8*).

Při kondenzaci vzniká 3-ketoacyl-CoA, který redukují a dehydratují enzymy KAR (3-ketoacyl-CoA reduktáza), HACD1-4 (3-hydroxyacyl-CoA dehydratáza), TER (2,3-trans-enoyl-CoA reduktáza) na MK elongovanou o C2. [obrázek 3] Tento proces se opakuje až do dosažení požadované délky řetězce (*9*). Vzniklé dlouhé MK mohou být desaturovány, a to pomocí SCD2 (stearoyl-CoA desaturáza) (*9, 27, 38*).

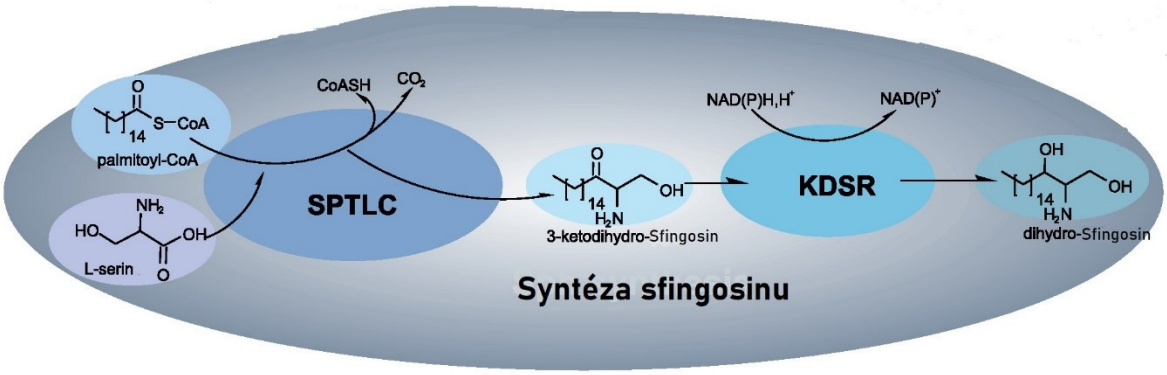


Obrázek 3: Průběh elongace MK (9)

CYP4F22 hydroxyluje MK v ω-poloze (*9, 25, 27, 39*), Pro napojení ultradlouhé MK na ceramid je potřeba mít její acetylkoenzym, což zajišťuje transportní protein FATP4 (*11, 14, 22, 27*).

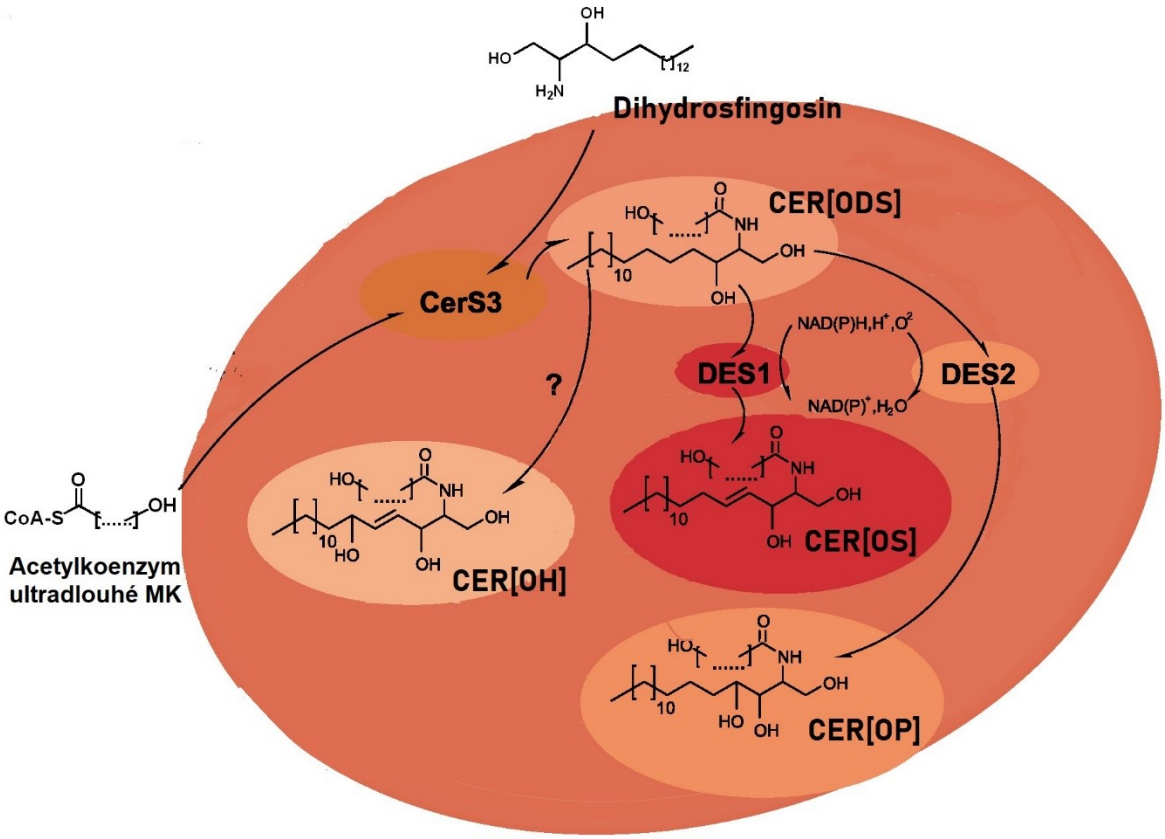
Biosyntéza sfingoidní báze

De novo syntéza ceramidů probíhá v endoplazmatickém retikulu (*20*). Prvním krokem je vznik sfingosinu, který začíná kondenzací palmitoyl-CoA a L-serinu pomocí SPTLC (serinpalmitoyltransferázy) (*9, 27, 32*), klíčového enzymu syntézy ceramidů (*8, 14*) . Vzniká 3-ketodihydrosfingosin, který v následujícím kroku redukuje enzym KDSR (3-ketodihydrosfingosin reduktáza) a vzniká dihydrosfingosin (*9, 27, 32*). [obrázek 4]



Obrázek 4: Syntéza sfingosinu (9)

Poté nastupují ceramidsyntázy 1-6, které katalyzují vznik ceramidů z dihydrosfingosinu a acyl-CoA. Ceramidsyntáza 3 (CERS3) katalyzuje jako jediná reakci s acyl-CoA ultra dlouhých mastných kyselin (*8, 9, 27, 28*) [obrázek 5]. Ceramidsyntázy dokáží kromě de novo syntézy katalyzovat i reacylaci ceramidu (*9*). Z dihydrosfingosinu může poté enzymatickým působením vzniknout jiná LCB. DEGS1 (sfingolipid Δ4-desaturáza) tvoří sfingosin, DEGS2 (sfingolipid C4-hydroxyláza) (*28, 32*) tvoří fytosfingosin, enzym tvořící CER[H] stále není znám (*40*).



Obrázek 5: Vznik ceramidu a modifikace LCB (9)

Linoleát, který se nachází v acylceramidech, je nezbytný pro správnou funkci kůže (*1, 3, 8*). Esterifikaci ω-OH ceramidu na ω-*O*-linoleoylceramid katalyzuje PNPLA1 (*22, 27, 41, 42*). PNPLA1 získává linolovou kyselinu potřebnou k esterifikaci z TAG (triacylglycerolů) (*11, 14, 27, 41, 42*).

Nově vzniklé ceramidy jsou okamžitě převedeny na glukosylceramidy nebo sfingomyeliny a uloženy do lamelárních granul (*32*). Většina CER je převedena na glukosylceramidy, na sfingomyeliny je to pouze CER[NS] a CER[AS] (*1, 16, 31, 32, 43*). Glukosylceramidy vznikají napojením glukózy na primární hydroxyskupinu LCB β-glykosidickou vazbou (*31, 33*) pomocí enzymu glukosylceramidsyntáza (*27, 44*). Sfingomyelinsyntáza je enzym tvořící sfingomyelin tak, že přenáší fosforylcholin z fosfatidylcholinu (*31*).

Lamelární granula

Lamelární granula jsou organely, které se nachází uvnitř granulocytů (*13*), jsou také zvané lamelární tělesa (dále LG) (*44, 45*). Keratinocyty zpočátku LG vůbec neobsahují, ty se objevují

až ve *stratum spinosum* (*3, 8, 46*) a k přesunu lipidů do nich dochází ve *stratum spinosum* i SG (*1*). Glukosylceramidy do LG doručuje lipidový transportér ABCA12 (*8, 11, 44, 47*). LG obsahují glukosylceramidy, sfingomyeliny, fosfolipidy (*4, 8, 44*) a cholesterol (*8, 44, 46*), což jsou poměrně polární lipidy (*1, 8*), a také rozmanitou škálu enzymů, hlavně lipid hydrolázy (β-glukosylcerebrosidázu, kyselou sfingomyelinázu) (*3, 8, 45, 46*) ale i 12*R*-LOX a eLOX3 (enzymy nezbytné pro oxidaci acylceramidů) (*24*). Uvnitř LG je většina (až 80 % (*27*)) acylglukosylceramidů asociována s membránou (glukóza je orientována dovnitř, prekurzory CLE) a zbytek je asociována v lamelách (*27, 33*).

V rámci proměny granulárních buněk na korneocyty dochází k exocytóze LG na rozhraní SG a SC (*1, 27*). Kyselá sfingomyelináza přeměňuje sfingomyelin na ceramidy (*3, 8, 44*). Glukosylceramidy na požadované ceramidy štěpí enzym β-glukosylcerebrosidáza. (*8, 13, 20*). Tato enzymatická aktivita přemění relativně polární lipidy LG v nepolární lipidy SC (*1, 43*).

Vznik CLE

CLE vzniká z acylceramidů, které se nachází uvnitř LG souběžně s exocytózou LG (*9, 24, 27*), kdy se aktivují enzymy tvořící CLE (*41*). Důvod, proč se hydrolytické enzymy zaktivují až po exocytóze LG je pravděpodobně to, že uvnitř LG je příliš malé množství vody (*27*). CLE je v bazálnějších částech SC tenčí, což také naznačuje, že postupně dozrává (*34, 41*). Alespoň v 60 % případů se CLE váže přes cystein (*48*).

Starší teorie vzniku kovalentní vazby ceramidu na CE se zabývaly transesterifikací. Konkrétně se předpokládalo, že se oxidovaný acylceramid pomocí TGM1 naváže přes ω-hydroxylovou skupinu na glutamátové postranní řetězce proteinu involukrinu (*49, 50*). Už před objevem mechanismu SDR9C7 bylo kontroverzní, zdali vazba skutečně probíhá tímto mechanismem, protože pacienti s deficitem TGM1 mají normální korneocytární lipidovou obálku (*22, 31*). Ani po objevení nového mechanismu popsaném níže však není tato teorie zcela zavržená (*14, 27, 34, 48*).

Novější hypotéza vzniku navrhuje navázání CLE přes linoleátovou část acylceramidu. Nejprve dochází k oxidaci linolové kyseliny pomocí lipoxigenáz 12*R*-LOX a eLOX-3 (*39*). 12*R*-LOX vytvoří z linoleátu hydroperoxid a eLOX3 pokračuje tvorbou hydroxylovaného epoxidu (*27,*

34). Poté nastupuje SDR9C7, dehydrogenáza-reduktáza, která tvoří epoxy-enon z hydroxylovaného epoxidu [schéma 3].

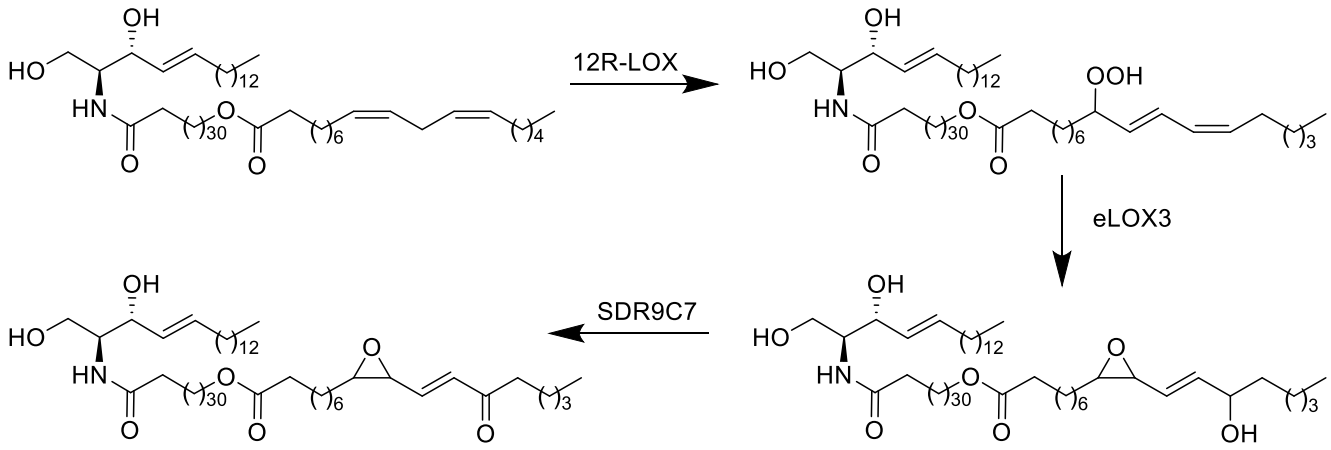


Schéma 3: Vznik acylceramidu s epoxy-enonovanou linolovou kyselinou

Reaktivní epoxy-enon se váže na aminokyseliny v CE pomocí Michaelovy adice (*9, 14, 34, 51*) [schéma 4]. Prvním důkazem pro tuto hypotézu byla ARCI (autozomálně recesivní kongenitální ichtyóza, blíže vysvětleno v kapitole Patologické změny ceramidů), která vzniká při poruše tvorby SDR9C7 (*52, 53*). Dnes už byla potvrzena přítomnost takto navázaných CER na cysteinu i reaktivita cysteinu s epoxy-enonem (*48*).V neposlední řadě je důkazem pro navázání přes epoxy-enon i to, že po extrakci CLE alkalickou hydrolýzou zůstává povrch korneocytu hydrofobní, za což pravděpodobně mohou zbytky linolové kyseliny (*26*).

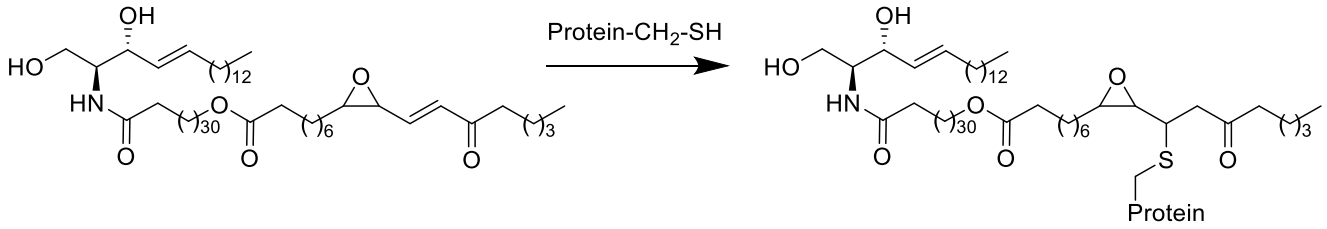
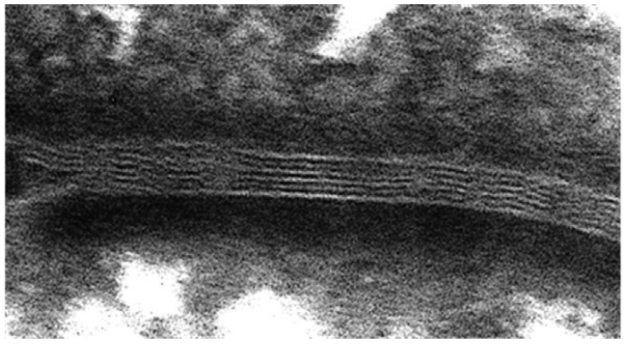


Schéma 4: Vazba acylceramidu na CE přes cystein

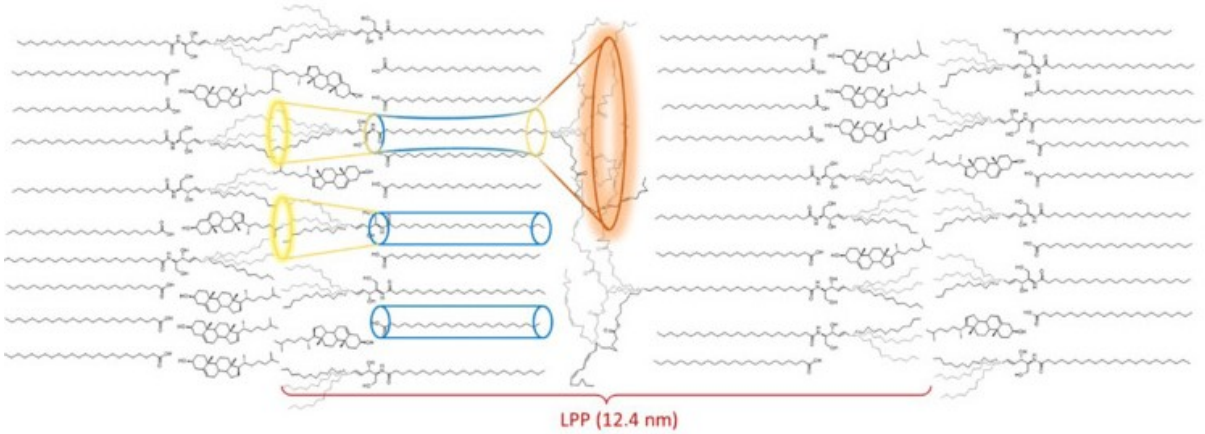
Lipidové lamely

Lamely mají fázi krátké periodicity SPP (okolo 60 Å/6 nm) a dlouhé periodicity LPP (okolo 130 Å/13 nm) (*1, 7, 16, 18, 21, 54*). Lipidové lamely jsou orientované paralelně s povrchem korneocytu (*1, 18, 21*) [obrázek 6]. Na přechodu SG v SC je uspořádání lipidů granulární, proces uspořádání lipidových lamel je dokončen ve 3.–5. vrstvě buněk SC (*36*).Acylceramidy jsou nutné pro vznik LPP (*55, 56*). Pokles acylceramidů spojený s poruchami v LPP se objevuje u mnoha kožních onemocnění (lamelární ichtyózy, atopická dermatitida, psoriáza) (*16*).



Obrázek 6: Lipidové lamely, obrázek z elektronového mikroskopu (56)

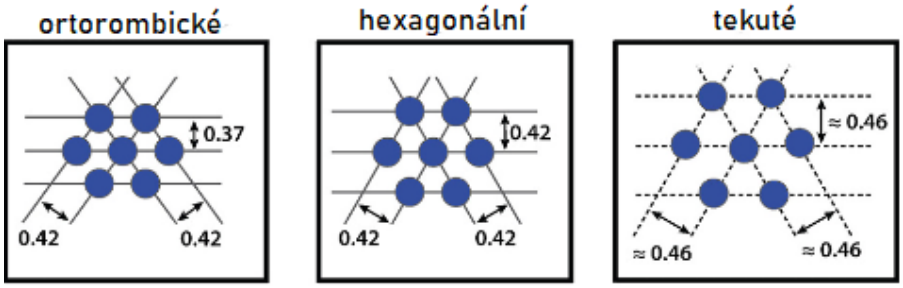
Ceramidy se v LPP nachází ve splayed (řetězec LCB směruje na jednu stranu a řetězec MK na stranu druhou) konformací (*7, 17, 57*). K LCB se asociuje cholesterol, zatímco volné mastné kyseliny se asociují s částí vycházející z mastné kyseliny ceramidu [Obrázek 7] (*17, 18*).



Obrázek 7: Předpokládaná organizace lipidů v lamelách (57)

Laterální uspořádání intercelulárních lipidů

Mohou existovat tři krystalické fáze (tj. laterální uspořádání): tekutá (neuspořádaná), hexagonální (uspořádaná s rovnoměrným rozložením řetezců) a ortorombická (uspořádaná s nerovnoměrným rozložením řetězců) [obrázek 8]. Ortorombická má nejlepší bariérovou funkci (*1*). Kůže fyziologicky obsahuje hlavně ortorombické uspořádání, s malou částí hexagonálního (*16, 54*). Zvýšení hexagonální fáze na úkor ortorombické se objevuje u atopické dermatitidy i lamelárních ichtyóz (*2, 16*). Acylceramidy podporují vznik ortorombického uspořádání (*54*).



Obrázek 8: Uspořádání krystalických fází (7)

Patologické změny ceramidů

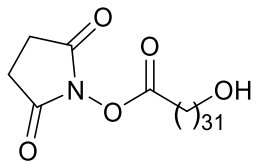
Ichtyóza je označení pro skupinu genetických onemocnění, která se projevují hyperkeratózou, suchou a zešupinovatělou kůží, dochází ke zvýšeným ztrátám vody přes SC *(39, 58)*. Existuje mnoho typů ichtyóz, ale pro téma této práce jsou důležité hlavně autozomálně recesivní kongenitální ichtyózy ARCI, kdy je mutace v některém z genů ovlivňujících syntézu acylceramidů, korneocytární lipidové obálky či lipidových lamel (*39, 58*). ARCI je rozmanitá skupina onemocnění, zatím bylo objeveno 14 genů, jejichž mutace je mohou způsobovat (*52*). ARCI se dle projevů dělí na lamelární ichtyózy (velké tmavé šupiny bez erytému), nebulózní kongenitální ichtyóziformní erytroderm NBCIE (jemné světlé šupinky s erytémem) a nejzávažnější harlequinské ichtyózy (někdy vyčleňované) (*58, 59*), které se projevují vznikem tlustých hyperkeratických šupin (*58*) a jsou způsobeny mutacemi v genu pro transportér ABCA12 (*22, 31, 58*). Mnohé ARCI jsou spojené s poruchami v genech pro biosyntetické enzymy ceramidů, např. CERS3 (chybí ceramidy s ultradlouhým řetězcem) (*8, 22, 40*), CYP4F22 (*22*) (absence acylceramidů i ω-hydroxyceramidů (*11, 14*)), PNPLA1

(nedostatek CER[EO*], absence CLE) (*56, 60*), 12*R*-LOX, eLOX3 (*8, 38*) a SDR9C7 (*52, 53*) (poškozen vznik CLE (*22, 51*)).

Kromě ichtyóz se změny hladin ceramidů objevují i u zánětlivých onemocnění atopické dermatitidy a psoriázy. Trendy ve změně hladin skupin ceramidů u atopiků a psoriatiků jsou podobné (*7*). Objevuje se deficience acylceramidů (*2, 7, 20, 55*) a snížené množství ceramidů s dlouhým řetězcem (MK s 20-26C) (*4, 7, 12, 19*). Změny v CLE pak korespondují se změnami ve volných ceramidech (*7, 34*). Suplementace ceramidy může být nápomocná při atopické dermatitidě (*3, 20*), kdy se jeví jako dobrá alternativa např. pro kortikoterapii, která má celou řadu nežádoucích účinků (*9*). Proto se ceramidy nachází ve velkém množství kosmetických přípravků (*1, 20*). Existují návrhy na využití suplementace specifickými syntetickými ceramidy u ichtyóz (*39, 56, 60, 61*), ale zatím nejsou prozkoumané v klinických studiích (*39, 61*).

Syntéza sfingosinu, ceramidů a acylceramidů

Tato kapitola uvede několik příkladů, jakými je možné připravovat sfingosin, ceramidy a acylceramidy různých podtříd. Samozřejmě existují i další metody pro přípravu zmíněných látek, avšak cílem této kapitoly bylo uvést jen příklady. Syntézy ceramidů jsou obecně náročné z důvodu nízké rozpustnosti a reaktivity (*62, 63*). Nejčastější způsob přípravy ceramidů využívá *N*-acylaci LCB mastnou kyselinou. Tato MK musí být aktivovaná (*63*). Jednou z metod aktivace je využití sukcinimidylesteru MK (*62, 63*). [obrázek 9]



Obrázek 9: Sukcinimidylester 32-hydroxydotriakontanové kyseliny

Další možností aktivace je využití chloridu MK (*64, 65*) nebo *p*-nitrofenylesteru (*66*). [schéma 5]

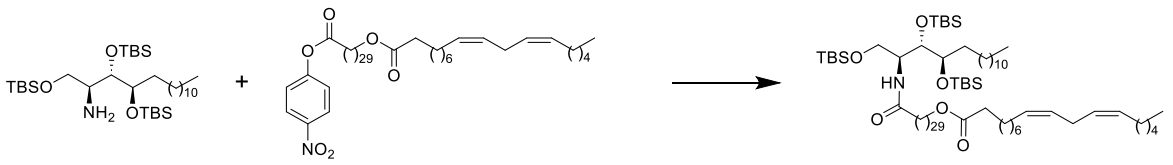
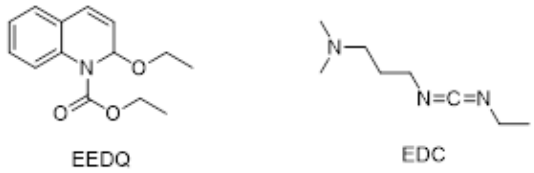


Schéma 5: Syntéza CER[EOP] využívající MK aktivovanou p-nitrofenylesterem (TBS = chránící skupina terc-butyldimethylsilyl)(66)

Je popsaná i metoda *N*-acylace, která využívá jako aktivační činidlo karbodiimid (DCC, EDC, …) s chráněním hydroxyskupin LCB (*66-68*) i bez chránění (*69*). Také se používá aktivační činidlo EEDQ [obrázek 10] (*70*).



Obrázek 10: Aktivační činidla pro acylaci ceramidu

Existuje několik způsobů, jak připravit ultradlouhé MK, které jsou založené na spojení dvou kratších MK. Jednou z možností je kometateze (*67*), což je typ reakce, ve kterém si dva olefiny vymění substituenty na dvojné vazbě. Využívá se při nich Grubbsův katalyzátor (*71*). [schéma 6]

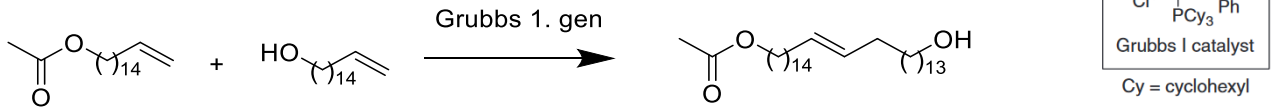


Schéma 6: Syntéza ultradlouhé MK kometatezí + použitý Grubbsův katalyzátor (67)

Další metodou tvorby ultradlouhé MK je pomocí Wittigovy reakce (*62*). [schéma 7]

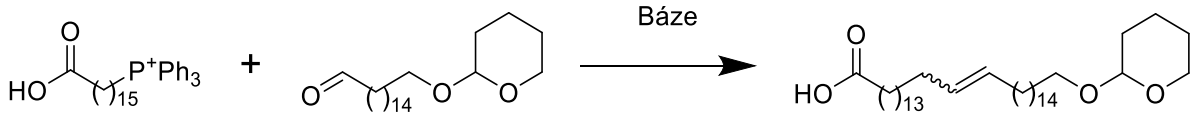


Schéma 7: Tvorba ultradlouhé mononenasycené MK Wittigovou reakcí (62, 66)

U obou dvou metod vzniká mononenasycená MK, která je v následujícím kroku redukována (*62, 67*).

Kromě *N*-acylace lze ceramidy připravit (podobně jako MK) pomocí kometateze (*63, 72*). [schéma 8]

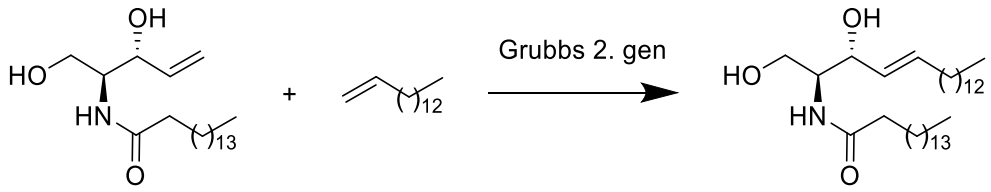
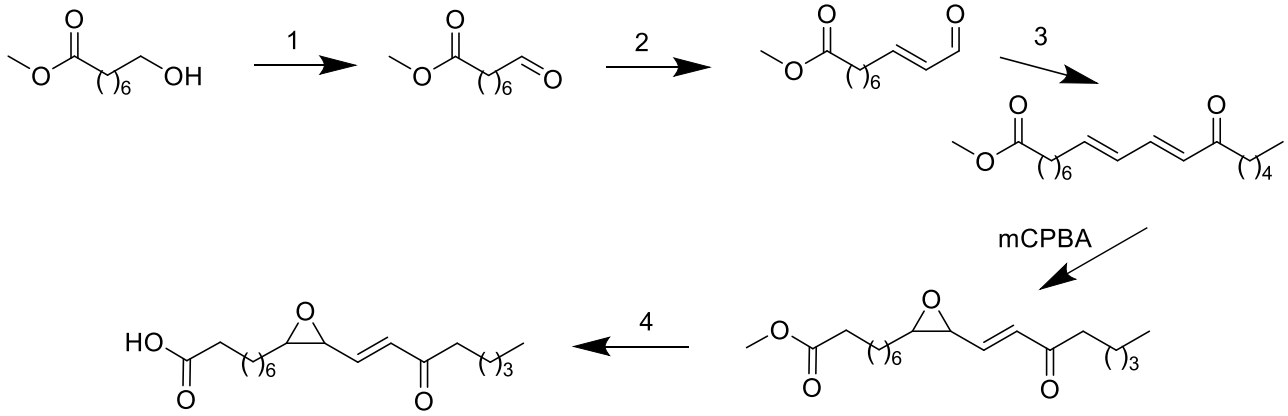


Schéma 8: Syntéza ceramidu kometatezí

Při syntéze sfingosinu je potřeba věnovat pozornost vzniku správné stereochemie, a to jak chiralitě, tak konfiguraci na dvojné vazbě. Syntézy sfingosinu často vychází z L-serinu nebo jeho derivátů, jako je Garnerův aldehyd, což je asi nejčastěji používaný prekurzor sfingosinu (*63*). Tento aldehyd obsahuje jako chránící skupiny terc-butyloxykarbonyl (BOC) a acetonid (*73*) [obrázek 11]

Obrázek 11: Struktura L-serinu a Garnerova aldehydu

Na závěr této kapitoly stojí za zmínku i to, že byla popsána úspěšná syntéza epoxy-enonového derivátu kyseliny linolové [schéma 9] (*74*). Zatím však nebyla popsaná syntéza acylceramidu, který by obsahoval tuto kyselinu.



1 = Dessova-Martinova oxidace, 2 = Wittigova reakce, 3 = Hornerova–Wadsworthova–Emmonsova reakce, 4 = hydrolýza

Schéma 9: Syntéza epoxy-enonového derivátu kyseliny linolové (74)

Diskuze a výsledky

Syntéza sfingosinu

První částí této diplomové práce byla syntéza sfingosinu dvoukrokovou syntézou dle schématu níže [schéma 10]. Vychází z Garnerova aldehydu, který reagoval s pentadecynem v přítomnosti zirkonocenového katalyzátoru. Tato reakce je nazývána jako Schwartzova reakce a vede selektivně ke vzniku produktu se správnou stereochemií na uhlíku číslo 3 sfingosinu a zároveň selektivně ke vzniku trans-dvojné vazby. Stereoselektivita této reakce je ovlivněna přídavkem aditiva ve formě buď bromidu zinečnatého (anti-selektivní) nebo diethylzinku (syn-selektivní) (*75*). Výtěžek správného izomeru potom činil 69 %. Vzniklý produkt byl odchráněn kyselou hydrolýzou pomocí trifluoroctové kyseliny (výtěžek 80 %). Celkový výtěžek této syntézy byl 55 %.

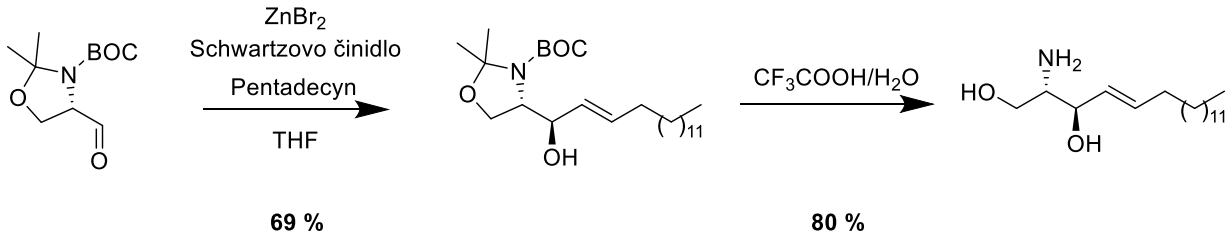


Schéma 10: Schéma syntézy sfingosinu

Metoda chránění sfingosinu v podobě trimethylsilyletheru

Druhou částí byla tvorba selektivně chráněného prekurzoru acylceramidu. Tento prekurzor má ochráněné hydroxyskupiny na polární hlavě sfingosinu, ale volnou ω-hydroxyskupinu MK, což nám umožňuje selektivně esterifikovat pouze tuto hydroxyskupinu. Tento prekurzor se může připravit ve velkém množství a dle potřeby modifikovat různými substituenty, což je zjednodušení oproti dřívější metodě (*62*), ve které se ω-acyl napojuje na ultradlouhou MK a poté se celá tato molekula napojuje na sfingosin. Ovšem u přípravy epoxy-enonového derivátu by mohlo dojít ke komplikacím, jelikož tato část (enon) může ochotně reagovat s nukleofily jako je například NH_2 skupina sfingosinu. Další nespornou výhodou tohoto postupu je, že po připojení modifikovaného acylu (například v podobě epoxy-enonového derivátu linolové kyseliny) již dochází pouze k jedinému reakčnímu kroku a tím je odchránění OH skupin sfingosinu. Stabilita epoxy-enonového derivátu linolové kyseliny se totiž jeví jako

nejistá, proto redukce reakčních kroků zvýší pravděpodobnost přípravy požadovaného produktu. V rámci této práce byly prozkoumané tři možnosti tvorby prekurzoru acylceramidu.

První možností je chránění polární hlavy sfingosinu pomocí trimethylsilylových (TMS) skupin. Na sfingosin by se poté napojila aktivovaná MK (sukcinimidylester 32-hydroxydotriakontanové kyseliny), která by se esterifikovala Yamaguchiho esterifikací. Nakonec se odchrání hydroxyskupiny a vzniká cílový acylceramid. [schéma 11] První reakce této syntézy byla vyzkoušena v různých reakčních podmínkách – lišila se využitá zásada (triethylamin nebo lutidin), reakční ekvivalenty (byl využit až čtyřnásobný nadbytek TMSCl) a zvýšení teploty až do 45 °C. Navzdory naším očekáváním však při žádných z těchto podmínek nedošlo k navázání TMS na obě hydroxylové skupiny – při každé reakci došlo k ochránění pouze jedné z hydroxyskupin sfingosinu. Pravděpodobným vysvětlením je, že ochránění této skupiny prostřednictvím TMS snižuje reaktivitu a moduluje rozpustnost (ochránění pomocí *t*-BDMS v minulosti provedla má konzultantka Panagiota Velissari, takže se nezdá, že by příčinou bylo sterické bránění).

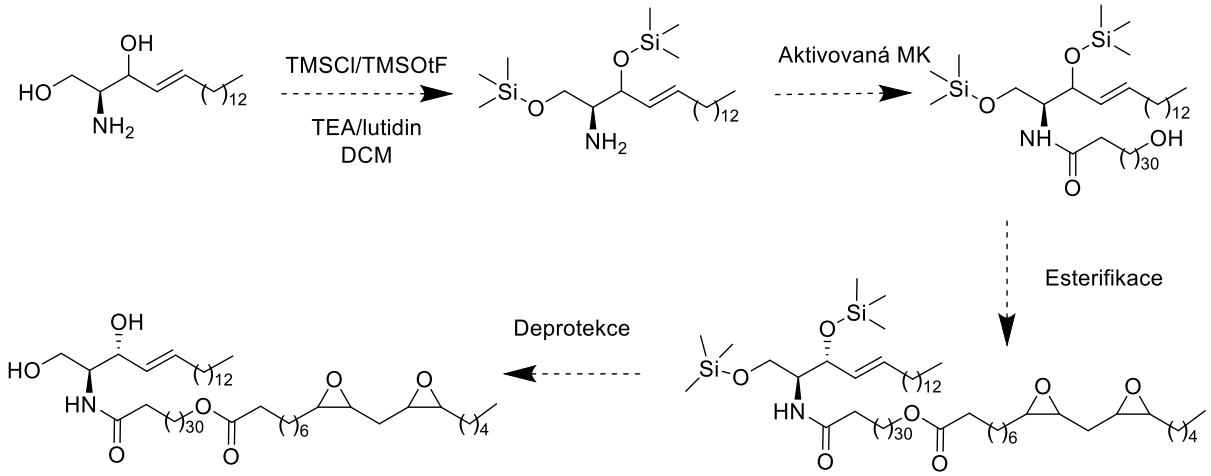


Schéma 11: Schéma návrhu syntézy acylceramidu přes prekurzor využívající silylaci sfingosinu. Aktivovaná MK = sukcinimidylester 32-hydroxydotriakontanové kyseliny, TEA = triethylamin, TMSCl = trimethylsilylchlorid, TMSOtF = trimethylsilyltriflát

Metoda chránění silylací MK

Druhou prozkoumanou variantou je chránění aktivované MK (sukcinimidylester 32-hydroxydotriakontanové kyseliny) pomocí *terc*-butyldimethylsilylové skupiny. Tuto metodu

vytvořila konzultantka této práce Panagiota Velissari. Aktivovaná MK byla nejprve ochráněna pomocí TBDMSCl na její volné OH skupině (výtěžek 74 %), poté byla tato ochráněná MK napojena na sfingosin (výtěžek 77 %). Dále byly hydroxyskupiny sfingosinu ochráněny pomocí acetonidové chránící skupiny (výtěžek 82 %). Nakonec byla hydroxyskupina MK odchráněna pomocí Olahova činidla (výtěžek 90 %). [schéma 12] Na schématu jsou zobrazené i další kroky (esterifikace a odchránění acetonidu), které jsou popsané v následující kapitole. Celkový výtěžek těchto čtyř kroků (tj. silylace MK – odchránění silylové skupiny z MK ceramidu) byl 42 %.

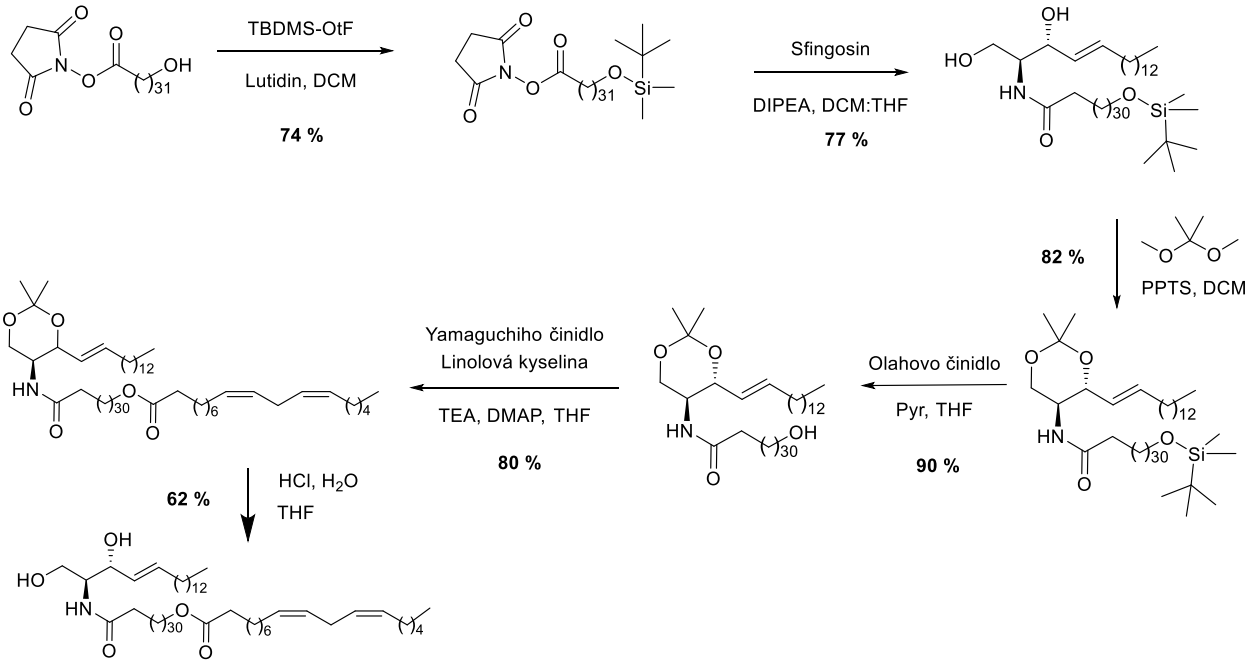


Schéma 12: Schéma syntézy acylceramidu přes prekurzor využívající silylaci MK, DIPEA = diisopropylethylamin, DMAP = dimethylaminopyridin, Olahovo činidlo = fluorid pyridinia, Pyr = pyridin, PPTS = pyridinium p-toluensulfonát, TBDMS-OtF = terc-butyldimthylsilyltriflát, Yamaguchiho činidlo = 2,4,6-trichlorbenzoylchlorid

Syntéza acylceramidu s linolovou kyselinou

Z prekurzoru acylceraidu byl dvoukrokovou syntézou vytvořen linoleoylacylceramid. V tomto případě se jedná o fyziologickou molekulu acylceramidu, která byla připravena v rámci našeho pracoviště už dříve. Avšak v tomto případě byla využita linolová kyselina pro optimalizaci jednotlivých kroků jakožto levná a dostupná výchozí látka (v porovnání s epoxy-enonovým derivátem linolové kyseliny, který není komerčně dostupný a musí se složitě připravovat). Na

uvolněnou hydroxyskupinu byla esterifikována linolová kyselina pomocí Yamaguchiho esterifikace (výtěžek 80 %) a na závěr byl kyselou hydrolýzou rozštěpem acetonid (výtěžek 62 %). [schéma 12] Yamaguchiho esterifikace fungovala dobře, větším problémem bylo odchránění acetonidové skupiny. Zde bylo vyzkoušeno odchránění pomocí Amberlystu 15, PTSA (*p*-toleunsulfonové kyseliny), kyseliny octové a kyseliny chlorovodíkové. K úspěšnému odchránění došlo pouze při využití HCl (při použití PTSA došlo k rozštěpení ceramidu na amidové skupině, u ostatních nedocházelo k reakci). Celkový výtěžek těchto dvou reakcí (Yamaguchiho esterifikace a odchránění acetonidu) byl 50 %, ale jelikož došlo při poslední sloupcové chromatografii ke ztrátě určitého množství materiálu, tak by při eliminaci lidské chyby byl tento výtěžek pravděpodobně vyšší.

Zdá se, že substituent na ω-hydroxyskupině výrazně mění reaktivitu a rozpustnost – u ceramidu acylovaného menším hydrofilnějším substituentem (který zkoumala Panagiota Velissari) bylo možné odchránit acetonidovou skupinu na finální acylceramid pomocí Amberlystu 15, což se při acylaci linolovou kyselinou nepodařilo. Z toho vychází, že při budoucím použití tohoto prekurzoru acylceramidu je nutné počítat s tím, že pro různé koncové substituenty mohou být vhodné jiné metody odchránění.

Syntéza epoxidovaného ceramidu

Vzhledem k tomu, že cílem tohoto projektu bylo nalezení nejvhodnějšího přístupu pro přípravu oxidovaných acylceramidů a optimalizace jednotlivých reakcí, v této fázi nebylo potřeba využít fyziologicky relevantní epoxy-enonový derivát linolové kyseliny, který je poměrně náročně dostupný. Namísto toho jsme zvolili jednodušší a snadněji dostupnou variantu oxidované linolové kyseliny. V tomto případě jsme použili jednoduchou tvorbu dvakrát epoxidované linolové kyseliny. První krok – tvorba epoxidované linolové kyseliny využívající mCPBA (*m*-chlorperoxobenzoovou kyselinu) – byl proveden úspěšně s výtěžkem 55 %. [schéma 13] Tento výtěžek je daný tím, že při sloupcové chromatografii částečně koeluovala mCPBA s epoxidovanou linolovou kyselinou. Při druhém pokusu o přečištění méně polární mobilní fází mCPBA stále koeluovala s epoxidovanou linolovou kyselinou, a tak k úplné separaci opět nedošlo. Dle NMR však tento vzorek neobsahuje žádnou neepoxidovanou linolovou kyselinu, takže by opakovaným čištěním mělo být možné dosáhnout vysokého

výtěžku. Navíc jsou linolová kyselina i mCPBA komerčně běžně dostupné sloučeniny, u kterých je nižší výtěžek snesitelný. Do další reakce byla použita pouze čistá frakce produktu.

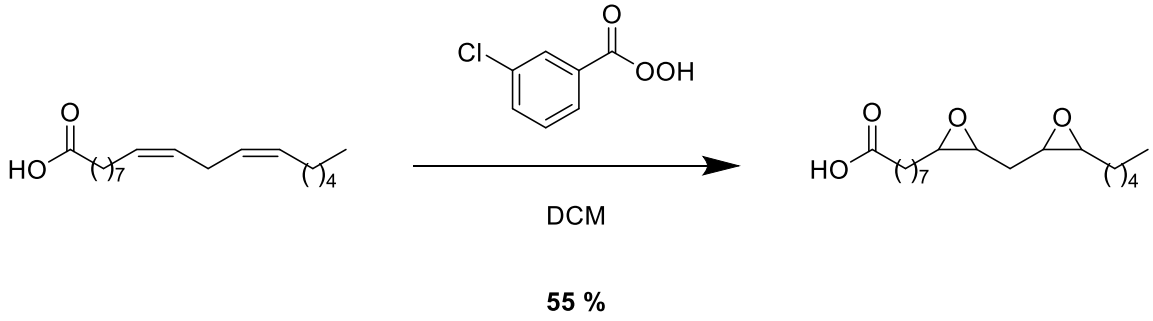


Schéma 13: Syntéza epoxidované linolové kyseliny

Dále byla provedena Yamaguchiho esterifikace obdobně jako u neepoxidované linolové kyseliny, s výtěžkem 57 %. Tento výtěžek je nižší, než byl u neepoxidované linolové kyseliny, takže tuto reakci by bylo vhodné v budoucnu ještě dále optimalizovat.

Každopádně pro odchránění polární hlavy ceramidu je potřeba použít šetrnější metodu, než jaká byla zde zvolena, protože při odchránění pomocí HCl se (i přes malé množství použité HCl a krátký čas reakce) dle ^{1}H NMR analýzy většina epoxidu rozložila na alkohol a zbylo pouze malé množství epoxidu, které nebylo možné vyseparovat. Jednou z možností je použití PTSA, ale v nižším množství. Zde bylo požita PTSA v množství 1,1:1 vůči chráněnému ceramidu. Některé deprotekce však užívají pouze katalytické množství, které by mohlo být šetrnější (např. 1 ekvivalent PTSA na 7 ekvivalentů ceramidu (*76*)). Další možností odchránění je *terc*-butylhydroperoxid (*77*). Toto činidlo bylo dříve využito k epoxidaci, takže by nemělo epoxidy rozkládat (*78*). Bohužel z časových důvodů již tyto reakce nebyly provedeny.

Pokud by se některá z těchto metod osvědčila, tak by bylo možné obdobně vytvořit acylceramid obsahující fyziologicky oxidovanou linolovou kyselinu, jejíž syntéza byla popsána (*74*). Jelikož je syntéza této MK výrazně náročnější než syntéza naší modelově epoxidované linolové kyseliny, tak je důležité nejprve optimalizovat syntézu modelově epoxidovaného acylceramidu.

Metoda chránění acetylací MK

Třetí metodou je chránění aktivované MK (sukcinimidylesteru 32-hydroxydotriakontanové kyseliny) pomocí acetylu. Tato cesta v rámci našeho projektu sloužila jako záložní řešení, které bylo rozpracováno, avšak nebylo dokončeno, jelikož předchozí postup fungoval spolehlivě až do posledního kroku. Nicméně, pro úplnost je zde zmínka o této cestě uvedena. Tato reakční sekvence probíhá obdobně jako předchozí varianta – aktivovaná MK je acetylována a poté je napojena na sfingosin, volné hydroxyskupiny se ochrání terc-butyldimethylsilylovými skupinami (TBDMS), acetyl se poté odštěpí bazickou hydrolýzou (toto je základní myšlenka zde popisovaného postupu, jelikož acetylová skupina by měla jako jediná reagovat s roztokem hydroxidu). Následně by se tento prekurzor esterifikoval a odchránila by se TBDMS skupina za vzniku finálního produktu. [schéma 14] První pokus byla acetylace pomocí acetanhydridu, kdy k reakci nedocházelo. Osvědčila se však další metoda, kdy byl k acetylaci použit acetylchlorid. Tato reakce proběhla úspěšně s výtěžkem 54 %. Tento výtěžek je nižší, než byl u chránění pomocí *terc*-butyldimethylsilylu (74 %). Tato metoda se tedy jeví jako méně vhodná. Potenciální využití tohoto typu chránění by mohlo být jako alternativa při tvorbě acylceramidů s MK obsahující funkční skupiny citlivé na kyselé prostředí, u kterých by nebylo možné odchránit acetonid a zároveň nerozložit acyl.

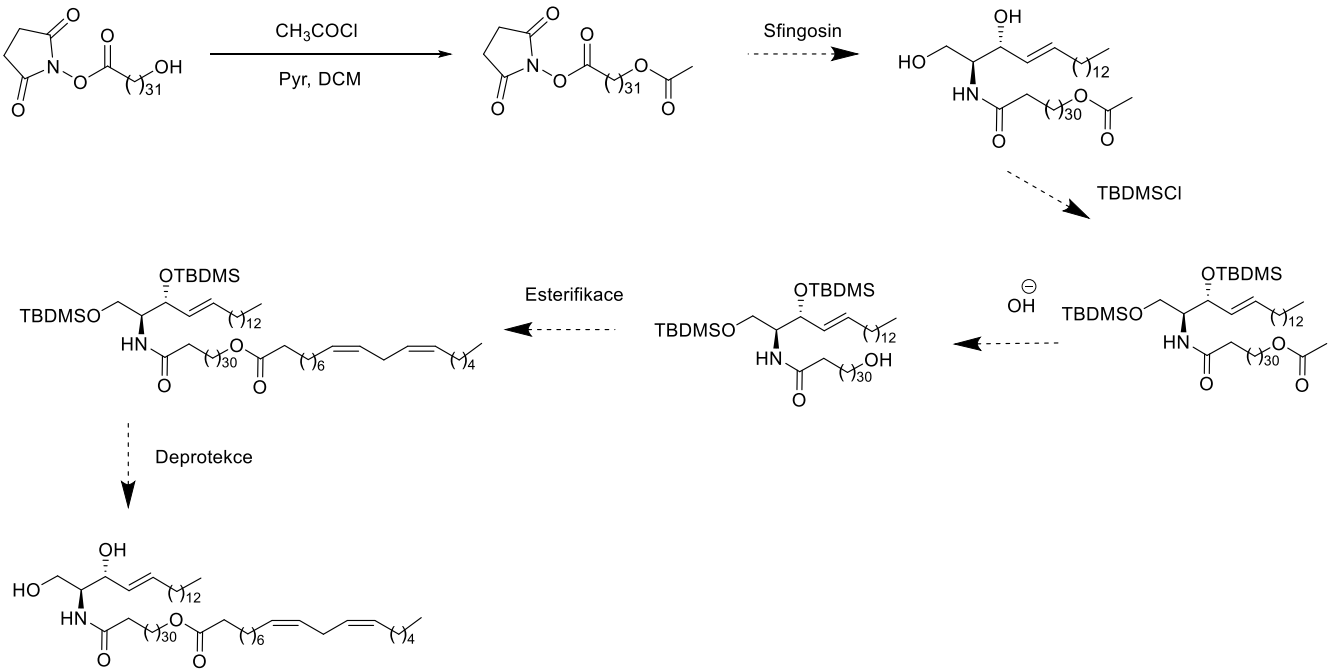


Schéma 14: Schéma návrhu syntézy acylceramidu přes prekurzor využívající acetylaci MK, Pyr = pyridin, TBDMSCl = terc-butylsilyldimethylchlorid

Experimentální část

Chemikálie a přístroje

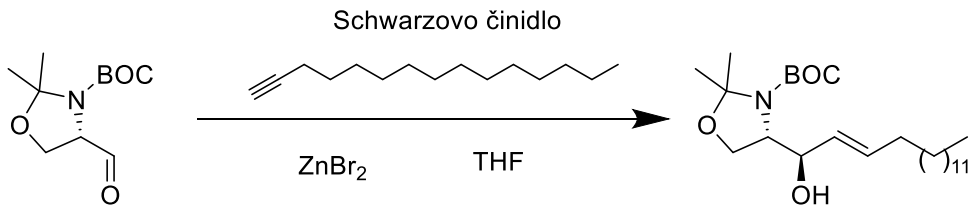
Reaktanty a rozpouštědla využita v této práci byla zakoupena od běžných dodavatelů v organické chemii (PENTA (Praha, Česká republika), Sigma-Aldrich (Burlington, USA), MERCK (Darmstadt, Německo)) a byla použita bez dalšího čištění. Výjimkou byl sukcinimid-1-yl 32-hydroxydotriakontanoát (aktivovaná MK), která není komerčně dostupná a byla připravena v rámci výzkumné skupiny Skin Barrier Reserch Group dle postupu popsaném v (*62*).

Na TLC byly použity desky Silikagel 60 F_{254} od firmy MERCK, detekce byla prováděna pomocí fosfosomolydenové kyseliny ($H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$) v roztoku se síranem ceričitým a kyselinou sírovou, v některých případech i pomocí UV detekce. ^{1}H i ^{13}C NMR spektra byla naměřena na spektrometrech VNMR S500 (Palo Alto, Kalifornie, USA) a Jeol JNM-ECZ600R (Tokyo, Japonsko). Chemické posuny byly zapsány jako δ hodnoty v ppm (parts per million) a byly nepřímo vztaženy na tetramethylsilan přes signál rozpouštědla.

.

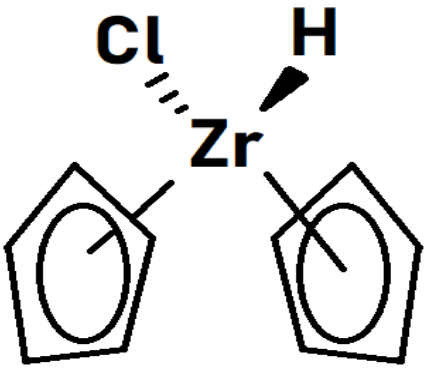
Syntéza sfingosinu

Syntéza 2,2-dimethylethyl ((4*S*)-4-((1*R*)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyl-1,3-oxazolidin-3-karboxylátu



1

Schwartzovo činidlo [obrázek 12] (4700 mg, 18,2 mmol) bylo rozpuštěno v 18 ml bezvodého THF a ochlazeno na 0 °C pod argonovou atmosférou. Byl přidán pentadecyn (3800 mg, 18,2 mmol) rozpuštěný ve 25 ml bezvodého THF a reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 1 hodiny. 2100 mg Garnerova aldehydu (9,16 mmol) bylo rozpuštěno v 25 ml bezvodého THF a po kapkách přikapáno do reakční směsi. Teplota byla postupně zvýšena na laboratorní a celá reakční směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě pod argonem. Reakce byla ukončena přídavkem vinnanového roztoku v ethylacetátu (1:1) a mícháním po dobu 10 minut. Následně byla suspenze přefiltrována a filtrát byl extrahován 1 × 50 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a vodná fáze 3 × 20 ml ethylacetátu. Spojené organické frakce byly odpařeny a surový produkt byl čištěn prostřednictvím sloupcové chromatografie s mobilní fází n-heptan/ethylacetát 7:1. Bylo získáno 2784 mg produktu **1**, což odpovídá výtěžku 69 %.



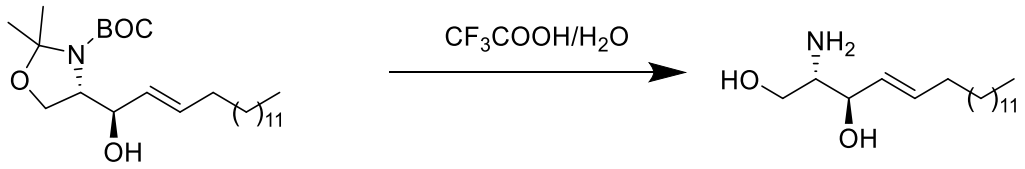
Obrázek 12: Schwarzovo činidlo (79)

Retenční faktor produktu **1** v mobilní fázi n-heptan/ethylacetát 7:1 byl 0,25. Produkt **1** byl charakterizován ^{1}H a ^{13}C NMR.

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 5.72 (dt, *J* = 14.3, 6.7 Hz, 1H), 5.43 (dd, *J* = 15.4, 6.2 Hz, 1H), 4.41 – 3.66 (m, 4H), 2.03 (dd, *J* = 8.3, 6.1 Hz, 2H), 1.77 – 1.32 (m, 15H), 1.32 – 1.16 (m, 22H), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 204.22, 133.52, 128.22, 94.53, 74.16, 65.03, 62.42, 32.49, 32.01, 29.76, 29.69, 29.59, 29.44, 29.33, 29.22, 28.46, 26.34, 22.77, 22.73, 14.20.

Syntéza (2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diolu (sfingosinu)



1 **2**

Chráněný sfingosin **1** (114 mg, 0,26 mmol) se nechal reagovat ve směsi trifluoroctové kyseliny a vody v poměru 3:1 (2,25ml CF_3COOH, 0,75 ml vody). Směs byla míchána 22 hodin za laboratorní teploty. Reakce byla ukončena neutralizací vodným roztokem amoniaku až do dosažení pH 9. Směs byla extrahována 3 × 50 ml chloroformu, spojené organické fáze byly ještě extrahovány 1 × 50 ml nasyceného roztoku NaCl. Organická frakce byla odpařena a přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/methanol/nasycený NH_4OH(aq) 130:25:4. Bylo získáno 62 mg produktu **2**, což odpovídá výtěžku 80 %.

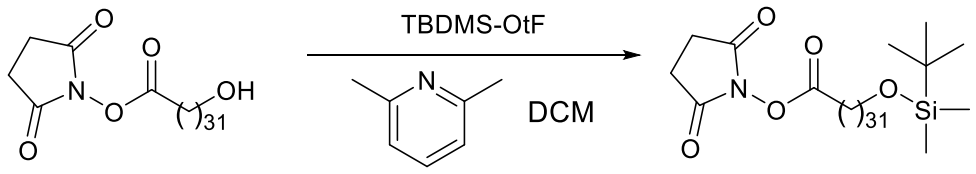
V mobilní fázi chloroform/methanol/nasycený NH_4OH(aq) 130:25:4 měl produkt **2** retenční faktor 0,26. Produkt **2** byl charakterizován pomocí ^1H a ^{13}C NMR.

^1H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 5.80 (dt, *J* = 14.4, 6.8 Hz, 1H), 5.40 (dd, *J* = 15.5, 6.2 Hz, 1H), 4.45 – 4.40 (m, 1H), 3.83 (qd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 2H), 3.30 (dt, *J* = 6.6, 3.7 Hz, 1H), 2.03 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.26 (s, 22H), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 136.17, 125.84, 70.94, 58.62, 56.60, 32.28, 31.96, 29.75, 29.69, 29.53, 29.38, 29.00, 22.69, 14.05.

Syntéza prekurzoru acylceramidu přes chránění aktivované MK pomocí *terc*-butyldimethylsilylové skupiny

Syntéza 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 32-(*terc*-butyldimethylsilyloxy)dotriakontanoátu



3

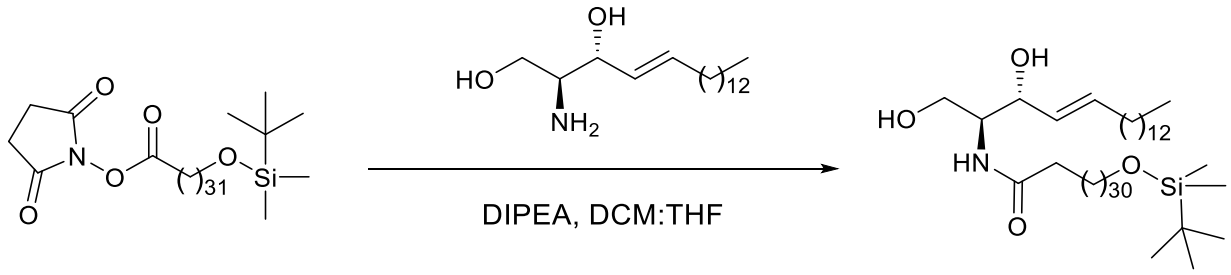
230 mg (0,39 mmol) aktivované MK (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 32-hydroxydotriakontanoátu) bylo rozpuštěno v 50 ml bezvodého DCM. Poté k ní bylo přidáno 135 mg (0,51 mmol) terc-butyldimethylsilyltriflátu (TBDMS-OtF) a 90 µl (0,84 mmol) 2,6-dimethylpyridinu. Směs byla míchána 20 hodin za pokojové teploty pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla extrahována 1 × 100 ml koncentrovaného vodného roztoku $NaHCO_3$ a vzniklá vodná fáze byla extrahovaná 3 × 50 ml chloroformu. Spojené organické frakce byly odpařeny a přečištěné pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform. Bylo získáno 203 mg produktu **3**, což odpovídá výtěžku 74 %.

Produkt **3** měl ve směsi cloroform/methanol 50:1 retenční faktor 0,74. Produkt **3** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR.

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 3.58 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.73 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.53 – 1.45 (m, 2H), 1.44 – 1.34 (m, 2H), 1.24 (s, 52H), 0.88 (s, 9H), 0.15 – -0.10 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 169.24, 168.77, 63.43, 32.98, 31.03, 29.79, 29.72, 29.64, 29.54, 29.44, 29.17, 28.88, 26.07, 25.89, 25.68, 24.66, 18.46, -5.17.

Syntéza *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-32-(terc-butyldimethylsilyloxy)dotriakontanamidu



3 **4**

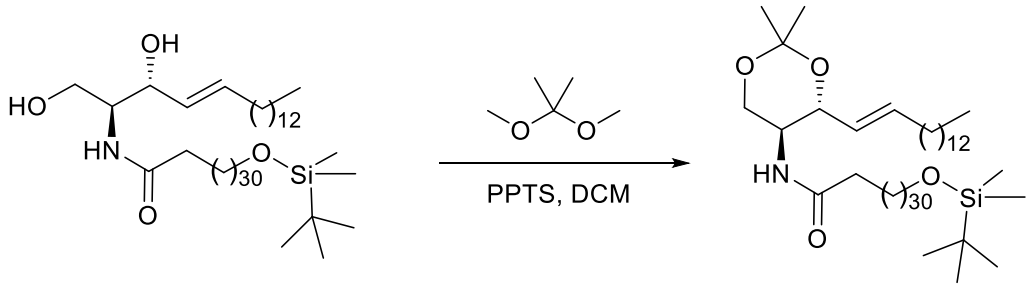
Chráněná MK **3** (178 mg, 0,253 mmol) byla rozpuštěna v 16 ml bezvodého DCM. V jiné baňce byl sfingosin/produkt **2** (112 mg, 0,374 mmol) rozpuštěn v 6 ml THF a tento roztok byl po rozpuštění přikapán do baňky s chráněnou MK. Nakonec bylo přidáno 170 mg (1,32 mmol) diisopropylethylaminu (DIPEA). Reakční směs byla míchána 46 hodin za pokojové teploty a pod argonovou atmosférou. Směs byla extrahována 1 × 50 ml nasyceného roztoku NaCl, vodná fáze byla poté extrahována 3 × 30 ml chloroformu. Spojené organické frakce byly vysušeny se síranem sodným, odpařeny a přečištěny pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol 30:1. Bylo získáno 177 mg produktu **4**, což odpovídá výtěžku 77 %.

Retenční faktor produktu **4** v systému chloroform/methanol 30:1 byl 0,32, v systému ethylacetát/n-hexan 1:1 0,31. Produkt **4** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR.

.^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 6.24 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.82 – 5.67 (m, 1H), 5.56 – 5.41 (m, 1H), 4.30 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.97 – 3.82 (m, 2H), 3.75 – 3.61 (m, 1H), 3.58 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.28 – 2.11 (m, 2H), 2.04 (m, 2H), 1.63 (td, *J* = 13.1, 5.7 Hz, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.24 (d, *J* = 2.9 Hz, 74H), 0.90 – 0.83 (m, 12H), 0.03 (s, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 174.01, 134.37, 128.90, 74.73, 63.45, 62.59, 54.58, 36.94, 32.98, 32.37, 32.01, 29.79, 29.71, 29.60, 29.54, 29.45, 29.38, 29.32, 29.21, 26.07, 25.89, 25.85, 22.78, 18.47, 14.20, -5.17.

Syntéza *N*-(((4*R*,5*S*)-2,2-dimethyl-4-((*E*)-pentadec-1-en-1-yl)-1,3-dioxan-5-yl)-32-(*terc*-butyl-dimethylsilyloxy)dotriakontanamidu



4 **5**

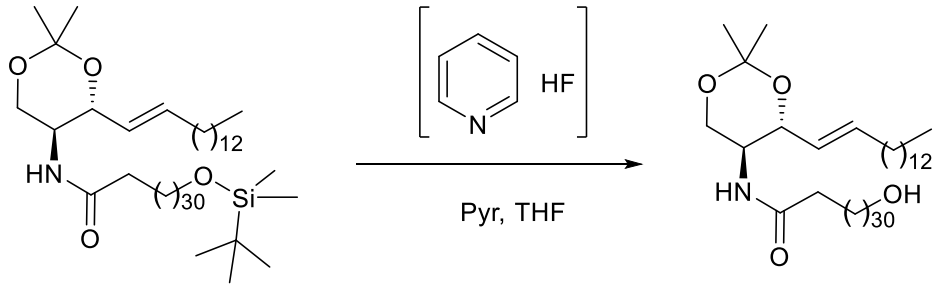
55 mg (0,062 mmol) ceramidu **4** bylo rozpuštěno ve 20 ml bezvodého DCM. K roztoku bylo přidáno 18 mg (0,064 mmol) pyridinium *p*-toluentsulfonátu (PPTS) a 13 mg (0,125 mmol) dimethoxypropanu. Reakční směs byla míchána pod argonovou atmosférou za pokojové teploty 19 hodin. Bylo extrahováno 1 × 50 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3, který byl extrahován 3 × 30 ml chloroformu. Spojené organické frakce byly vysušeny s Na_2SO_4, přefiltrovány, odpařeny a nakonec přečištěny pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází ethylacetát/n-hexan 1:1. Bylo získáno 20 mg produktu **5**, což odpovídá výtěžku 82 %.

Retenční faktor produktu **5** v mobilní fázi ethylacetát/n-hexan 1:1 byl 0.93. Produkt **5** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR.

1H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-D) δ 5.74 (dt, J = 15.3, 6.8 Hz, 1H), 5.46 – 5.34 (m, 1H), 5.13 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.10 – 3.93 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 3.64 (dd, J = 11.4, 9.4 Hz, 1H), 3.58 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.15 – 2.05 (m, 2H), 2.03 – 1.97 (m, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 8H), 1.24 (d, J = 2.9 Hz, 78H), 0.87 (d, J = 8.1 Hz, 12H), 0.03 (s, 6H).

13C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-D) δ 172.92, 136.56, 127.41, 98.91, 74.19, 63.43, 62.83, 48.22, 36.99, 32.98, 32.43, 32.02, 29.80, 29.76, 29.72, 29.61, 29.54, 29.46, 29.39, 29.36, 29.10, 28.59, 26.07, 25.89, 25.78, 22.78, 19.99, 18.46, 14.20, -5.17.

Syntéza *N*-(((4*R*,5*S*)-2,2-dimethyl-4-((*E*)-pentadec-1-en-1-yl)-1,3-dioxan-5-yl)-32-hydroxydotriakontanamidu



5 **6**

20 mg (0,021 mmol) ceramidu **5** bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodém THF, poté bylo přidáno 0,5 ml Olahova činidla (fluorid pyridinia) a 2,5 ml pyridinu (Pyr). Na začátku byla reakční směs zakalená, postupně se čeřila. Reakční směs byla míchána pod argonovou atmosférou za pokojové teploty po dobu 21 hodin. Poté k ní byl přidán nasycený vodný roztok K_3PO_4 až do dosažení pH 6. Směs byla extrahována pomocí 2 × 30 ml chloroformu a 1 × 30 ml THF, spojené organické fáze byly vysušeny pomocí Na_2SO_4, přefiltrovány a odpařeny. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází n-hexan/ethylacetát 2:1. Bylo získáno 16 mg produktu **6**, což odpovídá výtěžku 90 %.

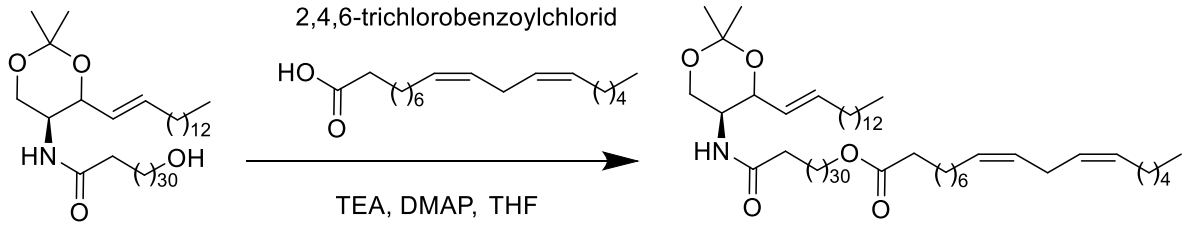
V mobilní fázi n-hexan/ethylacetát 1:1 měl produkt **6** retenční faktor 0,63. Produkt **6** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 5.74 (dt, *J* = 15.4, 6.6 Hz, 1H), 5.41 (dd, *J* = 15.5, 7.6 Hz, 1H), 5.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.16 – 4.02 (m, 2H), 4.00 – 3.96 (m, 1H), 3.82 (qd, *J* = 9.4, 5.4 Hz, 1H), 3.67 – 3.60 (m, 2H), 2.19 – 2.05 (m, 2H), 2.03 – 1.90 (m, 2H), 1.61 (dq, *J* = 20.3, 6.8 Hz, 4H), 1.42 (s, 6H), 1.24 (d, *J* = 3.7 Hz, 76H), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 173.02, 136.56, 127.39, 98.94, 74.17, 63.18, 62.82, 48.22, 36.98, 32.89, 32.43, 32.02, 29.79, 29.71, 29.61, 29.52, 29.46, 29.39, 29.36, 29.22, 29.10, 28.55, 25.83, 25.79, 24.01, 23.46, 22.78, 20.01, 14.20.

Syntéza acylceramidu s linolovou kyselinou

Syntéza 32-(((4R,5*S*)-2,2-dimethyl-4-((*E*)-pentadec-1-en-1-yl)-1,3-dioxan-5-yl)amino)-32-oxodotriakontyl (9*Z*,12*Z*)-oktadeka-9,12-dienoátu



6 **7**

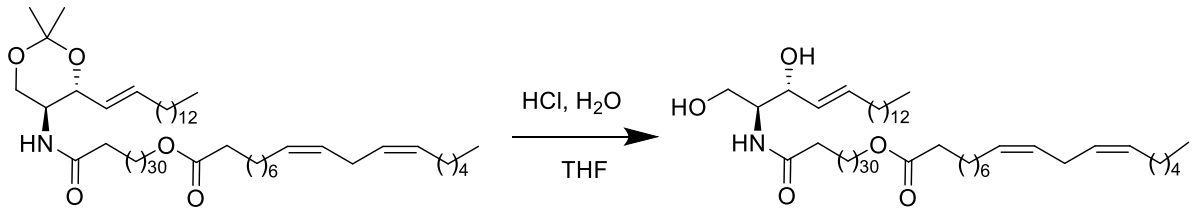
16 mg (0,0196 mmol) prekurzoru acylceramidu **6** bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého THF. V jiné baňce bylo 8 mg (0,03 mmol) linolové kyseliny rozpuštěno v 1 ml bezvodého THF a pomocí stříkačky přeneseno do baňky s reaktantem. Do této baňky bylo přidáno 5 mg (0,02 mmol) 2,4,6-trichlorbenzoylchloridu (Yamaguchiho činidla) a 5 mg (0,05 mmol) TEA. Po 3 minutách bylo přidáno 2 mg (0,012 mmol) 4-dimethylaminopyridinu (DMAP). Na začátku byla reakční směs čirá, ale rychle docházelo k zakalení. Reakční směs byla míchána za pokojové teploty pod argonovou atmosférou po dobu 19 hodin. Poté byla reakce ukončena odpařením rozpouštědla. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií v mobilní fázi n-hexan/ethylacetát 2:1. Bylo získáno 17 mg produktu **7**, což odpovídá výtěžku 80 %

Retenční faktor produktu **7** v mobilní fázi n-hexan/ethylacetát 2:1 byl 0,6 a ve fázi chloroform/methanol 20:1 0,77. Produkt **7** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR.

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 5.73 (dt, *J* = 15.3, 6.7 Hz, 1H), 5.44 – 5.29 (m, 5H), 5.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.10 – 3.90 (m, 4H), 3.82 (m, 1H), 3.64 (dd, *J* = 11.4, 9.4 Hz, 1H), 2.76 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.15 – 1.93 (m, 8H), 1.68 – 1.53 (m, 4H), 1.53 – 1.38 (m, 6H), 1.37 – 1.12 (m, 92H), 0.87 (q, *J* = 6.7 Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 174.06, 172.98, 136.57, 130.30, 130.13, 128.45, 128.12, 127.99, 98.92, 74.19, 64.50, 62.82, 48.21, 36.99, 34.49, 32.43, 32.02, 31.61, 29.80, 29.76, 29.68, 29.61, 29.54, 29.46, 29.39, 29.35, 29.26, 29.21, 29.10, 28.75, 28.58, 27.29, 26.03, 25.79, 25.72, 25.10, 22.78, 22.65, 19.99, 14.20, 14.15.

Syntéza 32-(((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)amino)-32-oxodotriakontyl (9*Z*,12*Z*)-oktadeka-9,12-dienoátu (acylceramid EOS)



7 **8**

Acetonid linoleoylceramidu **7** (10 mg, 0,0093 mmol) byl rozpuštěn v 10 ml THF. Poté byly do reakční směsi přidány 3 kapky vody a 1 kapka HCl (35 %). Reakční směs byla míchána 30 minut za pokojové teploty, poté byla reakce ukončena přidáním 20 ml vody. Vodná fáze vzniklé směsi separována a extrahována pomocí 2 × 20 ml DCM. Spojené organické fáze byly vysušeny síranem sodným a odpařeny. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází dichlormethan/methanol 50:1. Bylo získáno 6 mg produktu **8**, což odpovídá výtěžku 62 %, ale během sloupcové chromatografie došlo se ztrátě části roztoku s produktem.

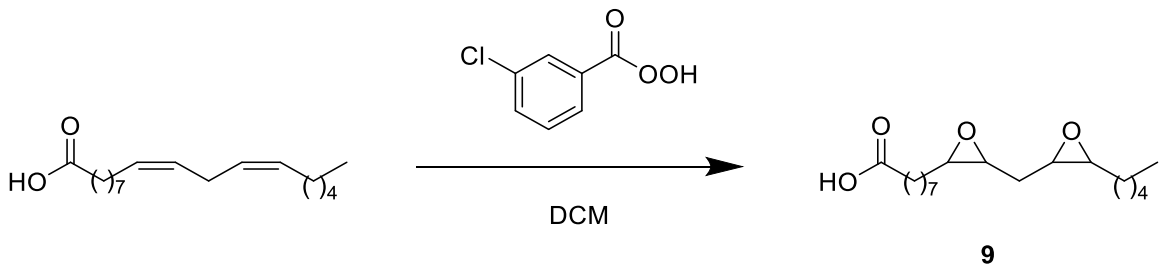
Produkt **8** má v mobilní fázi chloroform/methanol 50:1 retenční faktor 0,43. Produkt **8** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR.

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 6.22 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.77 (dt, *J* = 14.3, 6.8 Hz, 1H), 5.55 – 5.45 (m, 1H), 5.39 – 5.29 (m, 4H), 4.41 – 4.26 (m, 1H), 4.10 – 3.76 (m, 4H), 3.72 – 3.48 (m, 1H), 2.76 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.27 (m, 4H), 2.04 (m, 4H), 1.65 – 1.46 (m, 2H), 1.24 (d, *J* = 3.0 Hz, 96H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 174.08, 173.97, 134.41, 130.30, 130.14, 128.90, 128.12, 127.99, 74.83, 64.51, 62.63, 54.56, 36.93, 34.50, 32.36, 32.01, 31.61, 29.79, 29.75, 29.68, 29.62, 29.57, 29.45, 29.37, 29.35, 29.30, 29.26, 29.20, 28.74, 27.29, 26.02, 25.84, 25.72, 25.10, 22.78, 22.66, 14.20, 14.15.

Syntéza ceramidu s epoxidovanou linolovou kyselinou

Syntéza 8-(3-((3-pentyloxiran-2-yl)methyl)oxiran-2-yl)oktanové kyseliny (epoxidované linolové kyseliny)



9

Linolová kyselina (136 mg, 0,485 mmol) byla rozpuštěna v 20 ml DCM a do tohoto roztoku bylo přidáno 251 mg *m*-chlorperoxobenzoové kyseliny (mCPBA) se 77 % čistotou (odpovídá 193 mg a 1,12 mmol čisté mCPBA). Reakční směs byla míchána za pokojové teploty po dobu 50 minut, poté byla ukončena přidáním 20 ml vody. Směs byla extrahována dalšími 20 ml vody a spojené vodné frakce byly extrahované pomocí 2 ×30 ml DCM. Spojené organické frakce byly vysušeny pomocí Na_2SO_4, přefiltrovány a odpařeny. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol/kyselina octová 100:1:0,1. Při monitorování sloupcové chromatografie bylo pro detekci mCPBA na TLC desce využito UV a pro detekci epoxidované linolové kyseliny činidlo s fosfomolybdenovou kyselinou. Bylo získáno 82 mg produktu **9**, což odpovídá výtěžku 55 %.

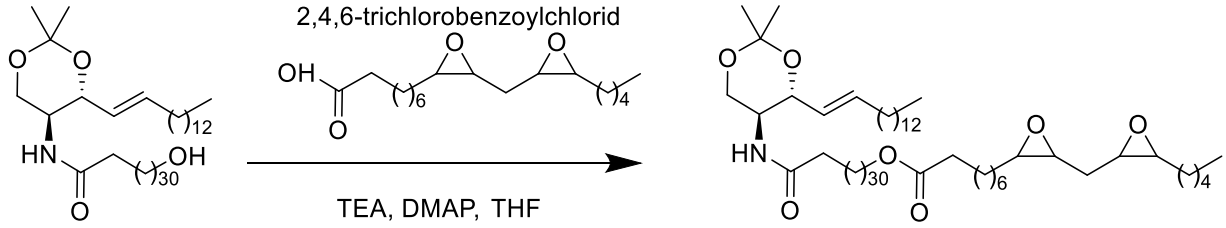
Produkt **9** měl v mobilní fázi chloroform/methanol/kyselina octová 100:1:0,1 retenční faktor 0,15 (mCPBA 0,22 a linolová kyselina 0,21). V mobilní fázi chloroform/methanol 50:1 měl produkt **9** retenční faktor 0,24. Produkt **9** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR.

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 3.16 – 2.83 (m, 4H), 2.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.82 – 1.66 (m, 2H), 1.61 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.56 – 1.39 (m, 8H), 1.33 (m, 10H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 179.56, 57.17, 57.10, 56.89, 56.80, 34.03, 31.74, 29.33, 29.19, 28.99, 27.94, 27.86, 27.26, 26.97, 26.58, 26.47, 26.31, 26.20, 24.69, 22.64, 14.06.

Zbytek ze sloupcové chromatografie byl přečištěn znova, tentokrát za použití sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol 150:1. Získaný produkt byl analyzován pomocí ^{1}H-NMR, ale opět se jej nepodařilo úplně přečistit.

Syntéza 32-(((4*R*,5*S*-2,2-dimethyl-4-((*E*)-pentadec-1-en-1-yl)-1,3-dioxan-5-yl)amino)-32-oxo-dotriakontyl 8-(3-((3-pentyloxiran-2-yl)methyl)oxiran-2-yl)oktanoátu



6 **10**

Reaktant **6** (31 mg, 0,038 mmol) byl rozpuštěn v 13 ml bezvodého THF. V jiné baňce bylo 14 mg (0,0426 mmol) epoxidované linolové kyseliny (produkt **9**) rozpuštěno v 5 ml bezvodého THF a pomocí stříkačky přeneseno do baňky s reaktantem. Do této baňky bylo přidáno 10 mg (0,042 mmol) Yamaguchiho činidla a 10 mg (0,097 mmol) TEA. Po 3 minutách bylo přidáno 3 mg (0,023 mmol) DMAP. Stejně jako u reakce s normální linolovou kyselinou se směs po pár minutách zakalila. Reakční směs byla míchána za pokojové teploty pod argonovou atmosférou po dobu 45 hodin. Poté byla reakce ukončena odpařením rozpouštědla. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií v mobilní fázi chloroform/methanol 50:1. Bylo získáno 25 mg produktu **10**, což odpovídá výtěžku 57 %.

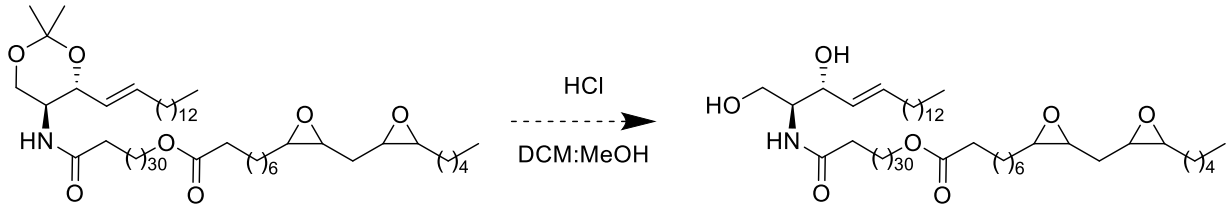
V mobilní fázi chloroform/methanol 50:1 měl produkt **10** retenční faktor 0,37. Produkt **10** byl charakterizován pomocí ^{1}H a ^{13}C NMR.

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 5.73 (dt, *J* = 15.5, 6.6 Hz, 1H), 5.41 (dd, *J* = 15.4, 7.6 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.11 – 3.90 (m, 4H), 3.81 (m, 1H), 3.68 – 3.58 (m, 1H), 3.15 – 2.85 (m, 4H), 2.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.14 – 2.05 (m, 2H), 2.00 (dt, *J* = 14.9, 7.5 Hz, 2H), 1.76 – 1.67 (m, 2H), 1.44 (d, *J* = 41.9 Hz, 6H), 1.35 – 1.15 (m, 100H), 0.87 (dt, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 174.00, 172.98, 136.50, 127.41, 98.92, 74.16, 64.52, 62.81, 57.10, 57.05, 56.82, 56.76, 48.22, 36.97, 34.43, 33.75, 32.42, 32.01, 31.75, 29.79, 29.74, 29.67, 29.61, 29.52, 29.45, 29.39, 29.35, 29.26, 29.17, 29.12, 29.09, 28.99, 28.74, 28.56,

27.96, 27.90, 27.30, 27.01, 26.62, 26.51, 26.45, 26.32, 26.21, 26.01, 25.91, 25.78, 25.03, 24.76, 22.77, 22.64, 22.55, 20.00, 14.19, 14.05.

Syntéza 32-(((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)amino)-32-oxodotriakontyl 8-(3-((3-pentyloxiran-2-yl)methyl)oxiran-2-yl)oktanoátu



10 **11**

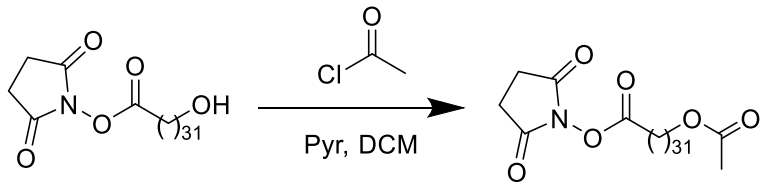
7 mg (0,0063 mmol) ceramidu **10** bylo rozpuštěno v 9 ml směsi DCM/methanol 2:1. Poté byla do reakční směsi přidána 1 kapka HCl (35 %) a 3 kapky vody. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 20 minut. Poté byla reakce ukončena přidáním TEA až do dosažení neutrálního pH. Poté byla směs extrahována 1 × 20 ml vody a získaná vodná frakce byla extrahována 3 × 20 ml chloroformu. Produkt **11** byl přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/methanol 50:1.

Produkt **11** byl charakterizován pomocí ^{1}H NMR.

Dle analýzy pomocí NMR pravděpodobně malé množství produktu vzniklo, byly patrné signály vodíků na oxiranových kruzích a zároveň zmizely signály vodíků acetonidu, avšak vzhledem k malému množství získaného produktu se jej nepodařilo úplně vyčistit. Nad tímto produktem převládal produkt, který měl signály vodíků na uhlíku vedle hydroxylových skupin. Tomuto stavu odpovídalo i TLC, které obsahovalo velké množství skvrn.

Syntéza prekurzoru acylceramidu pomocí chránění aktivované MK acetylací

Syntéza 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 32-(acetyloxy)dotriakontanoátu



12

Aktivovaná mastná kyselina (61 mg, 0,103 mmol) byla rozpuštěna v 20 ml bezvodého DCM a k ní přidáno 12 mg (0,15 mmol) acetylchloridu a 16 mg (0,206 mmol) pyridinu. Reakční směs byla míchána za pokojové teploty pod argonovou atmosférou po dobu 22 hodin. Poté byla provedena extrakce pomocí 1 × 50 ml nasyceného roztoku NaCl, který byl extrahován pomocí 3 × 50 ml chloroformu. Spojené organické frakce byly odpařeny a přečištěny pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol 100:1. Bylo získáno 35 mg produktu **12**, což odpovídá výtěžku 54 %.

V mobilní fázi chloroform/methanol 100:1 měl produkt **12** retenční faktor 0,68. Produkt **12** byl charakterizován pomocí ^{1}H NMR.

^{1}H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 4.08 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.86 (s, 4H), 2.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H) 1.73 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.65 – 1.59 (m, 2H), 1.24 (s, 54H).

Vzhledem k tomu, že v tomto přístupu nebylo dále pokračováno, produkt reakce nebyl více charakterizován.

Závěr

Hlavním cílem této práce byla příprava epoxidovaného acylceramidů, dílčími cíli byla příprava sfingosinu, prozkoumání metod tvorby prekurzoru acylceramidu a příprava linoleoylceramidu.

Sfingosin byl úspěšně připraven dvoukrokovou syntézou ve velkém množství s celkovým výtěžkem 55 %.

Byly vyzkoušeny tři metody tvorby prekurzoru acylceramidu. První z nich byla cesta přes trimethylsilylaci sfingosinu, která se bohužel ukázala jako nefunkční. Druhou byla čtyřkroková syntéza prekurzoru acylceramidu přes chránění MK pomocí *terc*-butyldimethylsilylu, která byla provedena úspěšně s celkovým výtěžkem 42 %. Dále byla připravena acetylovaná aktivovaná MK s výtěžkem 54 %, což je první krok pro novou metodu přípravy prekurzorů acylceramidů. Tato metoda má zatím v prvním kroku nižší výtěžek, než měla úspěšná metoda syntézy prekurzoru acylceramidu, ale má potenciální využití při syntéze acylceramidů s acyly citlivými na kyseliny. Z prekurzoru acylceramidu byl dvoukrokovou syntézou úspěšně připraven linoleoylceramid s celkovým výtěžkem 50 %. Dílčí cíle tohoto projektu se podařilo splnit.

Hlavního cíle této práce bylo dosaženo částečně, tedy syntézy epoxidovaného acylceramidu. Úspěšně byla připravena epoxidovaná linolová kyselina i estrefikace prekurzoru acylceramidu epoxidovanou linolovou kyselinou. Metoda použitá pro koncové odchránění produktu nebyla příliš šetrná na použití u epoxidovaného linoleoylceramidu a do budoucna bude potřeba vyzkoušet šetrnější metody, které jsou zmíněné v diskuzi. Cílovou molekulu se tedy podařilo připravit, avšak nepodařilo se ji spolehlivě oddělit od jejího degradačního produktu.

Zkratky

ABCA12 = ATP-vázající kazeta 12
ARCI = autozomálně recesivní kongenitální ichtyóza
BOC = terc-butyloxykarbonyl
CE = korneocytární obálka
CER = ceramid
CERS = ceramidsyntáza
CIE = kongenitální ichtyoziformní erythrodém
CLE = korneocytární lipidová obálka
CYP4F22 = cytochrom P450 izoforma F22
DCM = dichlormethan
DEGS1 (sfingolipid Δ4-desaturázy
DEGS2 (sfingolipid C4-hydroxyláza)
DIPEA = diisopropylethylamin
DMAP = 4-dimethylaminopyridin
EDC = *N*-etyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EEDQ = 2-etoxy-1-(etoxykarbonyl)-1,2-dihydrochinolin
ELOVL = elongáza velmi dlouhých MK
eLOX = epidermální lipoxygenáza
FATP4 = transportér MK 4
HACD1-4 = 3-hydroxyacyl-CoA dehydratáza
KAR = 3-ketoacyl-CoA reduktáza
KDSR = 3-ketodihydrosfingosin reduktáza
LCB = long chain base
LG = lamelární granula
LOX = lipoxygenáza
LPP = fáze dlouhé periodicity
MK = mastná kyselina
Olahovo činidlo = fluorid pyridinia
PNPLA1 = patatine-like phospholipase domain containing protein 1
PPTS = pyridinium *p*-toluensulfonát
PTSA = *p*-toluensulfonová kyselina
SDR = dehydrogenáza-reduktáza s krátkým řetězcem
SC = *stratum corneum*
SCD2 = stearoyl-CoA desaturáza 2
SG = *stratum granulosum*
SPP = fáze krátké periodicity
SPTLC = serinpalmitoyltransferáza
TAG = triacylglycerol
TBDMS = terc-butyldimethylsilyl
TBDMS-OtF = terc-butyldimethylsilyltriflát
TER = 2,3-trans-enoyl-CoA reduktáza
TGM = transglutamináza
THF = tetrahydrofuran
TMS = trimethylsilyl
TMS-OtF = trimethylsilyltriflát
Yamaguchiho činidlo = 2,4,6-trichlorbenzoylchlorid

Zdroje

1. F. F. Sahle, T. Gebre-Mariam, B. Dobner, J. Wohlrab, R. H. Neubert, Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin pharmacology and physiology* **28**, 42-55 (2015).
2. P. W. Wertz, Roles of lipids in the permeability barriers of skin and oral mucosa. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 5229 (2021).
3. K. R. Feingold, Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of lipid research* **48**, 2531-2546 (2007).
4. S. Knox, N. M. O'Boyle, Skin lipids in health and disease: A review. *Chemistry and Physics of Lipids* **236**, 105055 (2021).
5. M. Vietri Rudan, F. M. Watt, Mammalian epidermis: a compendium of lipid functionality. *Frontiers in physiology* **12**, 804824 (2022).
6. A. Zwara, K. Wertheim-Tysarowska, A. Mika, Alterations of ultra long-chain fatty acids in hereditary skin diseases. *Frontiers in medicine* **8**, 730855 (2021).
7. J. A. Bouwstra *et al.*, The skin barrier: an extraordinary interface with an exceptional lipid organization. *Progress in lipid research*, 101252 (2023).
8. K. R. Feingold, P. M. Elias, Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841**, 280-294 (2014).
9. F. Ge, K. Sun, Z. Hu, X. Dong, Role of omega-hydroxy ceramides in epidermis: Biosynthesis, barrier integrity and analyzing method. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 5035 (2023).
10. T. Murata, T. Honda, A. Mostafa, K. Kabashima, Stratum corneum as polymer sheet: concept and cornification processes. *Trends in molecular medicine* **28**, 350-359 (2022).
11. A.-Y. Lee, Molecular mechanism of epidermal barrier dysfunction as primary abnormalities. *International journal of molecular sciences* **21**, 1194 (2020).
12. G. Yang *et al.*, Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis. *International journal of molecular sciences* **21**, 2867 (2020).
13. K. C. Madison, Barrier function of the skin:" la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* **121**, 231-241 (2003).
14. A. Nicolaou, A. C. Kendall, Bioactive lipids in the skin barrier mediate its functionality in health and disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 108681 (2024).
15. A. E. Kalinin, A. V. Kajava, P. M. Steinert, Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* **24**, 789-800 (2002).
16. J. Van Smeden, M. Janssens, G. Gooris, J. Bouwstra, The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841**, 295-313 (2014).
17. A. Narangifard *et al.*, Human skin barrier formation takes place via a cubic to lamellar lipid phase transition as analyzed by cryo-electron microscopy and EM-simulation. *Experimental cell research* **366**, 139-151 (2018).
18. T. Schmitt, R. H. Neubert, State of the art in Stratum Corneum research: The biophysical properties of ceramides. *Chemistry and physics of lipids* **216**, 91-103 (2018).
19. K.-O. Shin, S. Kim, B. D. Park, Y. Uchida, K. Park, N-palmitoyl serinol stimulates ceramide production through a CB1-Dependent mechanism in in vitro model of skin inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 8302 (2021).

20. M. H. Meckfessel, S. Brandt, The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology* **71**, 177-184 (2014).
21. T. Schmitt, R. H. Neubert, State of the art in stratum corneum research. Part II: hypothetical stratum corneum lipid matrix models. *Skin Pharmacology and Physiology* **33**, 213-230 (2020).
22. M. Akiyama, Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *Journal of dermatological science* **88**, 3-9 (2017).
23. N. Jonca, M. Simon, The Cornified Envelope: A Versatile Contributor to the Epidermal Barrier. *The Journal of investigative dermatology* **143**, 1335-1337 (2023).
24. D. Crumrine *et al.*, Mutations in Recessive Congenital Ichthyoses Illuminate the Origin and Functions of the CorneocyteáLipid Envelope. *Journal of Investigative Dermatology* **139**, 760-768 (2019).
25. P. M. Elias *et al.*, Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841**, 314-318 (2014).
26. A. Dwivedi *et al.*, Lipid Monolayer on Cell Surface Protein Templates Functional Extracellular Lipid Assembly. *Small*, 2307793 (2024).
27. P. W. Wertz, Lipid metabolic events underlying the formation of the corneocyte lipid envelope. *Skin Pharmacology and Physiology* **34**, 38-50 (2021).
28. M. Suzuki, Y. Ohno, A. Kihara, Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases. *Journal of Lipid Research* **63**, 100235 (2022).
29. Y. Masukawa *et al.*, Characterization of overall ceramide species in human stratum corneums. *Journal of lipid research* **49**, 1466-1476 (2008).
30. M. Yamaji, Y. Ohno, M. Shimada, A. Kihara, Alteration of epidermal lipid composition as a result of deficiency in the magnesium transporter Nipal4. *Journal of Lipid Research* **65**, 100550 (2024).
31. W. M. Holleran, Y. Takagi, Y. Uchida, Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS letters* **580**, 5456-5466 (2006).
32. Y. Mizutani, S. Mitsutake, K. Tsuji, A. Kihara, Y. Igarashi, Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **91**, 784-790 (2009).
33. P. Wertz, Naturally occurring ω-Hydroxyacids. *International Journal of Cosmetic Science* **40**, 31-33 (2018).
34. P. W. Wertz, Linoleate-Containing Acylglucosylceramide, Acylceramide, and Events Associated with Formation of the Epidermal Permeability Barrier. *Skin Pharmacology and Physiology* **35**, 225–234 (2023).
35. L. Norlén, M. Lundborg, C. Wennberg, A. Narangifard, B. Daneholt, The skin's barrier: a cryo-EM based overview of its architecture and stepwise formation. *Journal of Investigative Dermatology* **142**, 285-292 (2022).
36. L. Norlén, Molecular Organization of the Skin Barrier. *Acta Dermato-Venereologica* **103**, adv 13356 (2023).
37. S. E. Hancock *et al.*, Mass spectrometry-directed structure elucidation and total synthesis of ultra-long chain (O-acyl)-ω-hydroxy fatty acids. *Journal of lipid research* **59**, 1510-1518 (2018).
38. H. Sampath, J. M. Ntambi, The role of fatty acid desaturases in epidermal metabolism. *Dermato-endocrinology* **3**, 62-64 (2011).
39. A. Vahlquist, H. Törmä, Ichthyosis: a road model for skin research. *Acta Dermato-Venereologica* **100**, 197-206 (2020).
40. A. Nicolaou, A. C. Kendall, Current insights into skin lipids and their roles in cutaneous health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **26**, 83-90 (2023).

41. J. M. Meyer *et al.*, Unbound corneocyte lipid envelopes in 12R-lipoxygenase deficiency support a specific role in lipid-protein cross-linking. *The American journal of pathology* **191**, 921-929 (2021).
42. Y. Ohno, A. Nara, S. Nakamichi, A. Kihara, Molecular mechanism of the ichthyosis pathology of Chanarin–Dorfman syndrome: stimulation of PNPLA1-catalyzed ω-O-acylceramide production by ABHD5. *Journal of Dermatological Science* **92**, 245-253 (2018).
43. M. Schmuth *et al.*, Permeability barrier disorder in Niemann–Pick disease: sphingomyelin–ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *Journal of investigative dermatology* **115**, 459-466 (2000).
44. S. Mahanty, S. R. G. Setty, Epidermal lamellar body biogenesis: insight into the roles of Golgi and lysosomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**, 701950 (2021).
45. P. M. Elias, J. S. Wakefield, Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Journal of allergy and clinical immunology* **134**, 781-791. e781 (2014).
46. P. Wertz, Epidermal lamellar granules. *Skin Pharmacology and Physiology* **31**, 262-268 (2018).
47. K. R. Feingold, Y. J. Jiang, The mechanisms by which lipids coordinately regulate the formation of the protein and lipid domains of the stratum corneum: Role of fatty acids, oxysterols, cholesterol sulfate, and ceramides as signaling molecules. *Dermato-endocrinology* **3**, 113-118 (2011).
48. Y. Ohno *et al.*, Determining the structure of protein-bound ceramides, essential lipids for skin barrier function. *Iscience* **26**, 108248 (2023).
49. L. N. Marekov, P. M. Steinert, Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17763-17770 (1998).
50. Z. Nemes, L. N. Marekov, L. Fésüs, P. M. Steinert, A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain ω-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 8402-8407 (1999).
51. T. Takeichi *et al.*, SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation. *The Journal of Clinical Investigation* **130**, 890-903 (2020).
52. L. Youssefian *et al.*, Knockdown of SDR9C7 impairs epidermal barrier function. *Journal of Investigative Dermatology* **141**, 1754-1764. e1751 (2021).
53. Y. Shigehara *et al.*, Mutations in SDR9C7 gene encoding an enzyme for vitamin A metabolism underlie autosomal recessive congenital ichthyosis. *Human molecular genetics* **25**, 4484-4493 (2016).
54. E. Mojumdar, Z. Kariman, L. Van Kerckhove, G. Gooris, J. Bouwstra, The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1838**, 2473-2483 (2014).
55. J. M. Meyer *et al.*, ALOX12B and PNPLA1 Have Distinct Roles in Epidermal Lipid Lamellar Organization. *Journal of Investigative Dermatology* **143**, 332-335. e334 (2023).
56. L. Opálka *et al.*, ω-O-Acylceramides but not ω-hydroxy ceramides are required for healthy lamellar phase architecture of skin barrier lipids. *Journal of Lipid Research* **63**, 100226 (2022).
57. F. Fandrei *et al.*, The intriguing molecular dynamics of Cer [EOS] in rigid skin barrier lipid layers requires improvement of the model. *Journal of Lipid Research* **64**, 100356 (2023).
58. T. Takeichi, M. Akiyama, Inherited ichthyosis: non-syndromic forms. *The Journal of dermatology* **43**, 242-251 (2016).
59. M. Wajid, M. Kurban, Y. Shimomura, A. M. Christiano, NIPAL4/ichthyin is expressed in the granular layer of human epidermis and mutated in two Pakistani families with autosomal recessive ichthyosis. *Dermatology* **220**, 8-14 (2010).

60. S. Grond *et al.*, PNPLA1 deficiency in mice and humans leads to a defect in the synthesis of omega-O-acylceramides. *Journal of Investigative Dermatology* **137**, 394-402 (2017).
61. M. Joosten, J. Clabbers, N. Jonca, J. Mazereeuw-Hautier, A. Gostyński, New developments in the molecular treatment of ichthyosis: review of the literature. *Orphanet journal of rare diseases* **17**, 269 (2022).
62. L. Opalka *et al.*, Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Organic Letters* **17**, 5456-5459 (2015).
63. C. D. Hunter, T. Guo, G. Daskhan, M. R. Richards, C. W. Cairo, Synthetic strategies for modified glycosphingolipids and their design as probes. *Chemical reviews* **118**, 8188-8241 (2018).
64. S. Iga *et al.*, Preparation of ceramide and sphingosine by chemical and biochemical methods–an instrument for the evaluation of compatibility between sphinganine and fatty acids. *Rom. Biotechnol. Lett* **16**, 6611-6617 (2011).
65. U. Hillaert, S. Van Calenbergh, Synthesis of a versatile (S)-3-(hydroxymethyl) butane-1, 2, 4-triol building block and its application for the stereoselective synthesis of N-homoceramides. *Organic Letters* **7**, 5769-5772 (2005).
66. Y. Masuda, K. Mori, Synthesis and Absolute Configuration of 6-Hydroxylated New Ceramides in Human Skin, Ceramides B, 4, 7 and 8. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 4789-4800 (2005).
67. T. Tashiro, K. Mori, Synthesis of sphingolipids with an ω-esterified long acyl chain, ceramide components of the human epidermis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **76**, 1715-1720 (2012).
68. K. Mori, Y. Masuda, Synthesis and stereochemistry of ceramide B,(2S, 3R, 4E, 6R)-N-(30-hydroxytriacontanoyl)-6-hydroxy-4-sphingenine, a new ceramide in human epidermis. *Tetrahedron letters* **44**, 9197-9200 (2003).
69. A. Kováčik, L. Opálka, M. Šilarová, J. Roh, K. Vávrová, Synthesis of 6-hydroxyceramide using ruthenium-catalyzed hydrosilylation–protodesilylation. Unexpected formation of a long periodicity lamellar phase in skin lipid membranes. *RSC advances* **6**, 73343-73350 (2016).
70. P. Wisse *et al.*, Synthesis of 6-hydroxysphingosine and α-hydroxy ceramide using a cross-metathesis strategy. *The Journal of Organic Chemistry* **80**, 7258-7265 (2015).
71. D. Astruc, The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments. *New Journal of Chemistry* **29**, 42-56 (2005).
72. T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi, S. Katsumura, Versatile synthetic method for sphingolipids and functionalized sphingosine derivatives via olefin cross metathesis. *Organic Letters* **8**, 5569-5572 (2006).
73. M. Passiniemi, A. M. Koskinen, Garner's aldehyde as a versatile intermediate in the synthesis of enantiopure natural products. *Beilstein journal of organic chemistry* **9**, 2641-2659 (2013).
74. G. S. Keyes, K. Maiden, C. E. Ramsden, Stable analogs of 13-hydroxy-9, 10-trans-epoxy-(11E)-octadecenoate (13, 9-HEL), an oxidized derivative of linoleic acid implicated in the epidermal skin barrier. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **174**, 102357 (2021).
75. T. Murakami, K. Furusawa, Efficient stereodivergent synthesis of erythro-and threo-sphingosines: unprecedented reversal of the stereochemistry in the addition. *Tetrahedron* **58**, 9257-9263 (2002).
76. S. Prévost, T. Ayad, P. Phansavath, V. Ratovelomanana-Vidal, Total synthesis of symbioramide: a flexible approach for the efficient preparation of structural isomers. *Advanced Synthesis & Catalysis* **353**, 3213-3226 (2011).
77. M. R. Maddani, K. R. Prabhu, Metal-free deprotection of terminal acetonides by using tert-butyl hydroperoxide in aqueous medium. *Synlett* **2011**, 821-825 (2011).
78. R. Sheldon, J. Van Doorn, Boron-catalyzed epoxidation of olefins with tert-butyl hydroperoxide. *Journal of Catalysis* **34**, 242-245 (1974).

79. M. M. Więcław, S. Stecko, Hydrozirconation of C= X Functionalities with Schwartz's Reagent. *European Journal of Organic Chemistry* **2018**, 6601-6623 (2018).