

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra organické a bioorganické chemie



**Optimalizace reakcí vedoucích k syntéze značených  
sfingoidních bází**

Diplomová práce

**Veronika Sovová**

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

*Konzultant: Mgr. Tomáš Havříšák*

Hradec Králové 2024

## **Poděkování**

Předně bych chtěla moc poděkovat svému školiteli PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a obrovskou trpělivost, kterou mi během experimentální části i psaní diplomové práce poskytl. Obrovské díky také patří mému konzultantovi Mgr. Tomáši Havrišákovi, za jeho odbornou a stále dostupnou pomoc, věcné připomínky a čas, který mi věnoval. Jejich podpora a vedení pro mě byly neocenitelné. Děkuji také ostatním členům *Skin Barrier Research Group* za milý přístup a technické rady poskytované v průběhu experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji mým blízkým, kteří mi poskytli psychickou podporu při zpracovávání i v průběhu experimentální části této práce.

## **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 2024

Veronika Sovová

# Abstrakt

Název diplomové práce: Optimalizace reakcí vedoucích k syntéze značených sfingoidních bází

Autor: Veronika Sovová

Školitel: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Tomáš Havrišák

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

*Skin Barrier Research Group*, Katedra organické chemie a bioorganické chemie

*Stratum corneum* (SC) představuje klíčovou část kožní bariéry, nacházející se na úplném povrchu epidermis, která podléhá neustálému procesu obnovy. SC je tvořeno zrohovatělými buňkami (korneocyty), lipidy a desmozomy, přičemž lipidová matrix je klíčová pro udržení bariérové funkce. Hlavními složkami těchto lipidů jsou ceramidy, cholesterol a volné mastné kyseliny. Ceramidy hrají zásadní roli v ochraně kůže a jejich základní složkou jsou sfingoidní báze, alifatické aminoalkoholy s dlouhým řetězcem, které tvoří spolu s mastnou kyselinou základní stavební bloky sfingolipidů. V kožní bariéře se nacházejí čtyři základní sfingoidní báze: sfingosin, dihydrosfingosin, fytosfingosin a 6-hydroxysfingosin. Tyto sloučeniny se liší přítomností dvojných vazeb a hydroxylových skupin, přičemž každá z nich přispívá k funkci a struktuře ceramidů v kůži.

Pro kvantifikaci lipidů z lidského SC se velmi často využívá hmotnostní spektrometrie. Aby však bylo možné látky pomocí této metody spolehlivě a přesně kvantifikovat, je potřeba využít vhodné vnitřní standardy, velmi často v podobě izotopově značených fyziologických molekul.

Cílem tohoto projektu bylo optimalizovat jednotlivé kroky syntézy sfingosinu, který v budoucnu bude obsahovat část řetězce s izotopovým značením. Prvním dílčím cílem bylo prověřit, zda naplánované reakce skutečně fungují a druhým dílčím cílem bylo dosáhnout co nejvyšších výtěžků jednotlivých reakcí. Projekt se zaměřil na syntézu fyziologického sfingosinu, do kterého by bylo možné vložit šesti uhlíkatý řetězec s vhodným značením. Fyziologický sfingosin byl připraven v deseti krocích s využitím hexanalů jako výchozí látky s celkovým výtěžkem přibližně 2 %. Vzniklý produkt s izotopovým značením bude sloužit k podrobnému studiu chování sfingolipidů ve SC

pomocí hmotnostní spektrometrie. Tento optimalizovaný syntetický postup byl vyvinut, aby poskytl cenný nástroj pro další výzkum v oblasti kožní bariéry a lipidového metabolismu.

# Abstract

Title of the master thesis: Optimization of reactions leading to the synthesis of labeled sphingoid bases

Candidate: Veronika Sovová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Consultant: Mgr. Tomáš Havrišák

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

*Skin Barrier Research Group*, Department of Organic and Bioorganic Chemistry

The stratum corneum (SC) represents a key part of the skin barrier, located on the entire surface of the epidermis, which is subject to a constant renewal process. The SC is made up of corneocytes, lipids and desmosomes, with the lipid matrix being crucial for maintaining barrier function. The main components of these lipids are ceramides, cholesterol and free fatty acids. Ceramides play a vital role in skin protection and their basic components are sphingoid bases, aliphatic amino alcohols with a long chain, which together with fatty acids form the basic building blocks of sphingolipids. There are four basic sphingoid bases in the skin barrier: sphingosine, dihydrosphingosine, phytosphingosine and 6-hydroxysphingosine. These compounds differ in the presence of double bonds and hydroxyl groups, each contributing to the function and structure of ceramides in the skin.

Mass spectrometry is very often used to quantify lipids from human SC. However, in order to reliably and accurately quantify substances using this method, it is necessary to use suitable internal standards, very often in the form of isotopically labeled physiological molecules.

The aim of this project was to optimize the individual steps of the synthesis of sphingosine, which in the future would contain part of the chain with isotopic labeling. The first sub-goal was to check whether the planned reactions actually work, and the second sub-goal was to achieve the highest possible yields of individual reactions. The project focused on the synthesis of physiological sphingosine into which it would be possible to insert a six carbon chain with appropriate labeling. Physiological sphingosine was prepared in ten steps using hexanal as a starting material with a total yield of approximately 2 %. The resulting isotopically labeled product will be used for a detailed study of the behavior of sphingolipids in the SC using mass spectrometry. This optimized

synthetic procedure was developed to provide a valuable tool for further research in the field of the skin barrier and lipid metabolism.

# Obsah

1.	Úvod a cíl práce .....	1
2.	Teoretická část.....	2
2.1	Kůže.....	2
2.1.1	Funkce kůže .....	3
2.1.2	Struktura kůže .....	5
2.2	Stratum corneum.....	7
2.2.1	Lipidy ve Stratum Corneum.....	8
2.2.2	Sfingolipidy .....	9
2.2.3	Sfingoidní báze .....	13
2.2.4	Ceramidy .....	14
2.2.5	Komplexní sfingolipidy .....	15
2.3	Syntetické postupy přípravy sfingosinu .....	16
2.4	Hmotnostní spektrometrie .....	19
2.4.1	Základní vlastnosti hmotnostního spektrometru.....	19
2.4.2	Izotopové značení .....	21
2.4.3	Příklady analytických metod nejčastěji využívaných pro sledování metabolismu sfingolipidů.....	22
2.4.4	Použití těžkých izotopů v molekule L-serinu .....	23
3.	Výsledky a diskuse .....	24
3.1	Schéma syntézy.....	25
3.2	Příprava Hexanalu .....	26
3.3	Fosfoniová sůl .....	29
3.4	Wittigova reakce .....	30
3.5	Hydrogenace dvojných vazeb .....	31
3.6	Redukce karboxylové kyseliny .....	31
3.7	Převedení na selenid.....	31
3.8	Příprava alkenu .....	31
3.9	Příprava vinylovaného GA.....	31



3.10	Grubbsova metateze alkenů .....	32
3.11	Odchránění polární hlavy .....	34
4	Experimentální část .....	35
4.1	Technické parametry a chemikálie .....	35
4.2	Postup přípravy .....	36
5	Závěr .....	47
6	Seznam zkratk .....	48
7	Použitá literatura .....	50

# 1. Úvod a cíl práce

Kůže je komplexní orgán, který nejen chrání tělo před vnějšími vlivy, ale také hraje klíčovou roli v imunitní odezvě a udržování homeostázy. Jedním z jejích zásadních komponentů jsou sfingolipidy, včetně sfingosinu, které se nachází ve SC, nejsvrchnější vrstvě epidermis. Sfingosin a jeho deriváty jsou klíčovými složkami v tvorbě a udržování kožní bariéry, a jejich správná funkce je nezbytná pro ochranu pokožky a její zdraví.

Přirozeně se vyskytující sfingoidní báze, jako jsou *D-erythro*-sfingosin, *D-ribo*-fytosfingosin, *DL-erythro*-dihydrosfingosin a 6-hydroxy-*D-erythro*-sfingosin, jsou také předmětem zájmu v rámci syntetických výrobních technologií. Syntéza těchto bází je klíčovým krokem pro výrobu lidských sfingolipidů a jejich derivátů, které mají široké možnosti využití v medicíně, kosmetice a dalších vědeckých oblastech. Volné sfingoidní báze, přirozeně se vyskytující na kůži a sliznicích, vykazují významnou antimikrobiální aktivitu proti různým oportunním bakteriím, virům a houbám. Tato vlastnost podtrhuje jejich význam v udržování zdraví pokožky a sliznic a poskytuje ochranu proti infekcím.

Hlavní náplní této práce je optimalizace syntézy sfingosinu. Specificky se zaměříme na syntézu fyziologického sfingosinu, který by ve své molekule obsahoval izotopově značenou část, v našem případě s  $^{13}\text{C}_6$  značenou částí řetězce. Tento přístup umožní detailní studium chování sfingosinu ve SC a jeho interakce s dalšími lipidy a proteiny v této vrstvě pokožky. Pro tento účel bude využita technika hmotnostní spektrometrie, která poskytne cenné informace o distribuci a metabolismu sfingosinu v kůži. Prvním dílčím cílem této práce je tedy prověření, jestli navržený postup syntézy povede zdárně k přípravě molekuly sfingosinu. Druhým dílčím cílem je poté optimalizace jednotlivých kroků syntézy pro dosažení maximálních výtěžků. V budoucnu by výsledky této práce měly vést k detailní analýze fyziologického sfingosinu a dalších sfingolipidů pomocí  $^{13}\text{C}_6$  značení, měly by přispět k lepšímu pochopení jejich role v kožní bariéře a případně otevřít nové možnosti pro aplikace v medicínských a kosmetických výrobcích. Cílem této práce je tedy nejen zlepšit syntetické postupy, ale také poskytnout nový náhled na funkci sfingosinu a jiných sfingolipidů v rámci komplexní struktury kůže.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kůže

Kůže je pro naše tělo velice významným a také plošně největším orgánem.<sup>1</sup> Její plocha se pohybuje od 1,5 do 2,0 m<sup>2</sup> v závislosti na tělesné výšce jedince a jeho konstituci.<sup>2</sup> Její vývoj začíná již v prenatálním období, konkrétně na přelomu 1. a 2. měsíce embryonálního vývoje. Tento proces probíhá ze dvou zárodečných vrstev embrya: ektodermu a mezodermu. Z ektodermu vzniká epidermis (povrchová vrstva kůže) a nervový systém, zatímco mezoderm se postupně mění na mezenchym, který je zdrojem pro vývoj dermis (škáry) a subcutis (podkožní vrstvy). Vývoj kůže lze rozdělit do tří hlavních období: organogeneze (1.–2. měsíc), histogeneze (3.–5. měsíc) a zrání (6.–9. měsíc). Během organogeneze se zakládají jednotlivé vrstvy kůže, začíná vývoj bazální membrány a kožních adnex (jako jsou vlasové folikuly a žlázy). V této fázi se také začínají tvořit první krevní cévy mezi dermis a podkožím, prorůstají nervová vlákna a objevují se prekurzory melanocytů (buňky produkující pigment) a Langerhansových buněk (imunitní buňky). V období histogeneze dochází k rozdělení kůže na dermis a hypodermis, a zároveň se formují žlázy, vlasové folikuly a nehty. Konečně v období zrání se tvoří rohová vrstva kůže (SC) a všechny kožní struktury dozrávají.<sup>3</sup> Tento vývoj je kompletně ukončen zhruba ve 34. týdnu těhotenství. Předčasně narozené děti, zejména ty, co jsou narozené před 30. nebo 32. týdnem těhotenství, nemají zcela vyvinutou kožní bariéru, což zvyšuje riziko dehydratace, nadměrné absorpce lokálních léků, chemikálií, a infekcí. Jejich kůže také vykazuje zvýšenou transepidermální absorpci kyslíku, což může mít zdravotní důsledky.<sup>4,5</sup> Ačkoli je definitivní vícevrstvá kůže přítomna už při narození, zůstává dynamickým orgánem, který se během života neustále obnovuje. Vnější vrstvy se odlupují a nahrazují vnitřními vrstvami.<sup>6</sup>

Tloušťka kůže může variabilně dosahovat od 1 do 4 mm, v závislosti na konkrétní oblasti těla a funkčních požadavcích, které jsou na ni kladeny.<sup>2</sup> Je určována tloušťkou epidermálních a dermálních vrstev. Například kůže bez chlupů, tedy na dlaních a chodidlech je nejtlustší, protože obsahuje *stratum lucidum*, což je další vrstva v epidermis, která přispívá k její odolnosti. Naopak, oblasti kůže, kde tato vrstva chybí, jsou považovány za tenčí. Horní část zad je považována za nejtlustší na základě tloušťky dermis, ale histologicky je považována za „tenkou kůži“, protože tloušťka epidermis postrádá vrstvu *stratum lucidum* a je tenčí než kůže bez chlupů.<sup>7</sup>

Mužská kůže je obecně silnější než ženská v každé části těla. U dětí je kůže naopak tenká a postupně sílí až do věku 40–50 let, kdy se pak opět ztenčuje. Toto ztenčení je způsobeno hlavně změnami v dermis, ztrátou elastických vláken, kožních přívěsků a mezibuněčné hmoty.<sup>6</sup>

### 2.1.1 Funkce kůže

Kůže plní řadu životně důležitých funkcí nezbytných pro celkové zdraví organismu. Její hlavní rolí je ochrana těla před mechanickým, tepelným a fyzickým poškozením, stejně jako před škodlivými látkami, mikroorganismy a UV zářením. Tato **ochranná bariéra** zabraňuje nejen nadměrné ztrátě nebo absorpci vody, ale také pronikání patogenů a toxinů. Epidermální bariéra, tvořená nerozpustnými proteiny na vnitřním povrchu plazmatické membrány, a hydrofobní lipidový obal na vnějším povrchu, hrají klíčovou roli v udržení integrity kůže. Keratinocyty ve *stratum spinosum* produkují keratohyalinová granula a lamelární tělíska obsahující směs lipidů, která se vylučuje do mezibuněčných prostor, čímž se zpevňuje ochranná bariéra. Přestože kůže účinně chrání tělo před vnějšími vlivy, je vystavena neustálému riziku zánětlivých a infekčních stavů kvůli kontaktu s potenciálními patogeny a škodlivými látkami.<sup>7, 8</sup>

**Imunitní funkce** kůže je klíčová pro její ochrannou roli, zahrnující jak adaptivní, tak vrozenou imunitu. V epidermis a dermis se nachází různé typy imunokompetentních buněk, které jsou zásadní pro detekci a eliminaci patogenů. Melanocyty a Langerhansovy buňky, nacházející se v epidermis, spolu s dendritickými buňkami, makrofágy a T-buňkami v dermis, hrají důležitou roli v aktivaci imunitních reakcí. V rámci vrozené imunity kůže produkuje různé peptidy s antibakteriálními a protiplísňovými vlastnostmi. Imunitní systém kůže je úzce propojen s keratinocyty, fibroblasty a cévními strukturami, což umožňuje efektivní komunikaci a dohled nad eliminací vnějších hrozeb. Narušení této souhry vede ke ztrátě homeostázy, což může způsobit zánětlivé a infekční stavy, jako je atopická dermatitida (AD) či ichtyóza.<sup>8,9</sup>

Kůže udržuje kontinuální **homeostázu**, včetně prevence ztráty vlhkosti a udržování správné hydratace těla, a hraje klíčovou roli v regulaci tělesné teploty prostřednictvím pocení a rozšiřování či zúžení krevních cév, které řídí rychlost odpařování a vstřebávání vody. Zároveň funguje jako **smyslový orgán**, vybavený nociceptory umožňujícími vnímat dotek, tlak, teplotu a bolest, což je zásadní pro ochranu těla a interakci s okolním prostředím.<sup>10</sup>

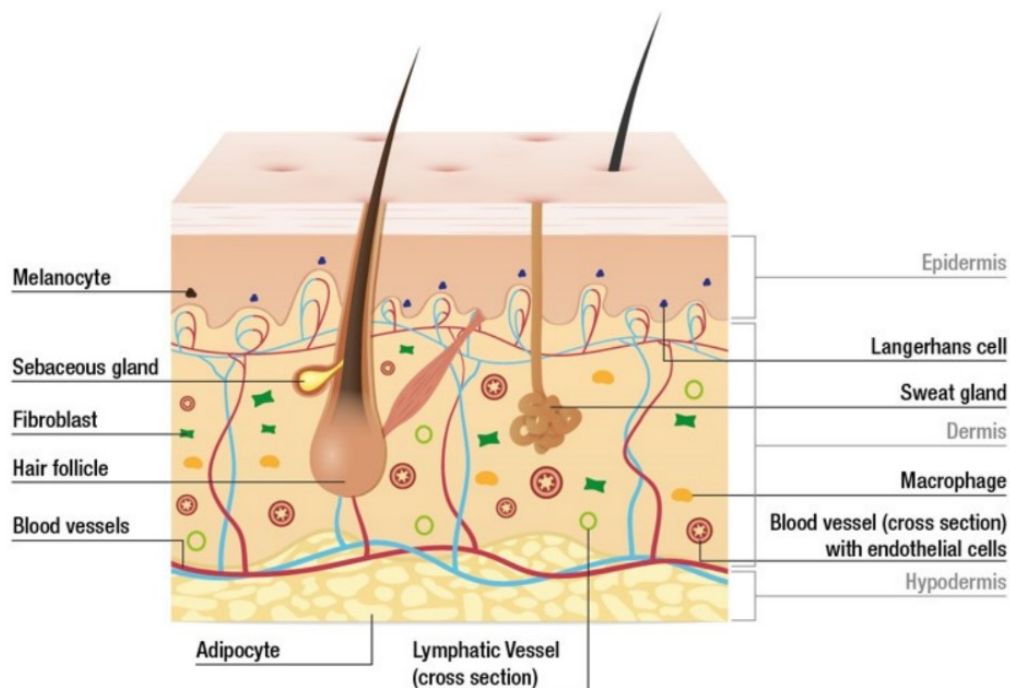
Kůže nejenže plní ochranné funkce, ale je také hormonálně a metabolicky aktivní. Je zapojena do různých **endokrinních a exokrinních procesů**, které mají klíčový vliv na zdraví a rovněž homeostázu organismu. Jedním z hlavních endokrinních úkolů kůže je syntéza vitamínu D. Keratinocyty, hlavní buňky epidermis, přeměňují 7-dehydrocholesterol na vitamín D pod vlivem ultrafialového (UV) světla. Tento proces je zásadní pro zdraví kostí a správnou funkci imunitního systému. Kromě toho keratinocyty exprimují receptor vitamínu D, který je důležitý pro jejich proliferaci a diferenciaci. Kromě produkce vitamínu D kůže rovněž vylučuje hormony, které ovlivňují různé fyziologické procesy. Například, kůže má schopnost syntetizovat hormony jako proopiomelanokortin, dopamin a  $\beta$ -endorfiny, které vznikají v důsledku vystavení UV záření. Tyto látky hrají roli v regulaci pigmentace a odpovědí na stres. Kůže je také součástí endokrinní osy, která zahrnuje hypotalamus, hypofýzu a nadledviny. Hormon uvolňující kortikotropin, produkovaný v kůži, interaguje s místními receptory a ovlivňuje vaskulární permeabilitu a diferenciaci keratinocytů. Kromě toho, v kůži existuje homologní systém osy hypotalamus-hypofýza-štítná žláza. Tento systém se projevuje přítomností hormonálních receptorů pro stimulaci štítné žlázy (TSH) a genů pro tyreoglobulin. Exokrinní funkce kůže zahrnují produkci potu, který reguluje tělesnou teplotu, a tvorbu kožního mazu, který chrání pokožku. Tyto funkce, společně s endokrinními procesy, ukazují na komplexní roli kůže v regulaci tělesných funkcí a odpovědí na vnější vlivy.<sup>8, 11</sup>

Další funkcí kůže je její role jako **diagnostický indikátor**. Charakteristiky pokožky, jako je pigmentace, hladkost, elasticita a turgor, poskytují důležité informace o celkovém zdravotním stavu jedince.<sup>8</sup>

**Kožní buňky se neustále obnovují** prostřednictvím buněčného dělení, keratinizace a deskvamace. Tento proces zahrnuje syntézu keratinových tonofilament, které se spojují do svazků zvaných tonofibrily, a produkci keratohyalinových granul ve *stratum spinosum*. Keratinocyty poté migrují směrem k povrchu, kde se postupně přeměňují na zrohovatělé buňky, které se nakonec odlupují. Všechny tyto funkce společně zdůrazňují komplexní a nezastupitelnou roli kůže v udržení celkového zdraví a ochrany organismu.<sup>7</sup>

## 2.1.2 Struktura kůže

Kůže je složena z komplexní sítě vrstev, která se dělí do tří hlavních částí: **epidermis**, **dermis** a **hypodermis**. Každá z těchto vrstev má odlišnou anatomickou strukturu a plní specifické funkce (Obrázek 1).



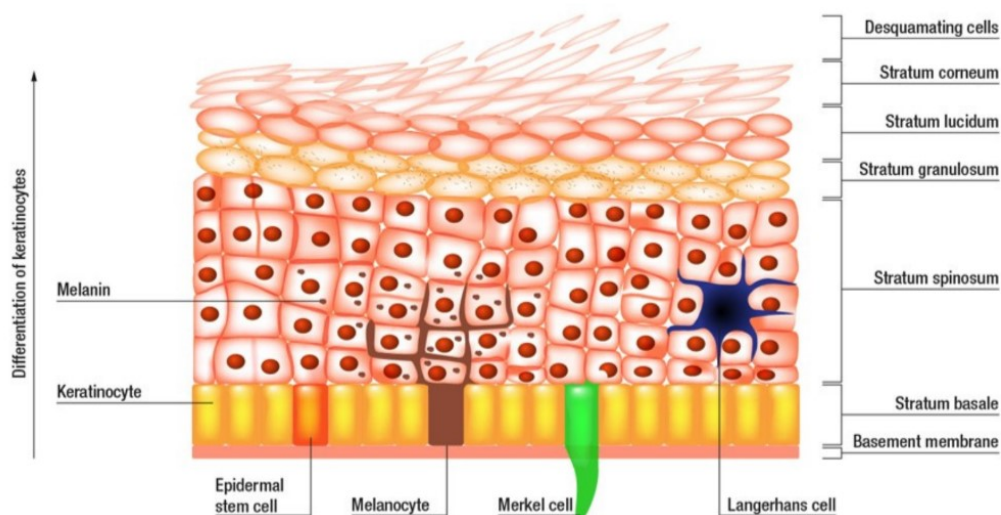
Obrázek 1: Hlavní vrstvy kůže<sup>12</sup>

**Hypodermis**, nejhlubší vrstva kůže, známá také jako podkožní tkáň nebo podkožní vrstva, je spodní vrstvou kůže nacházející se pod dermis.<sup>8</sup> Skládá se převážně z pojivové tkáně a tukových buněk, které slouží jako energetická rezerva a poskytují tepelnou izolaci těla.<sup>12</sup> Hypodermis také hraje klíčovou roli v ochraně vnitřních orgánů před mechanickým poškozením tím, že absorbuje nárazy. Tato vrstva navíc spojuje kůži s podkladovými strukturami, jako jsou svaly a kosti, a obsahuje krevní cévy a nervy, které zásobují horní vrstvy kůže.<sup>8, 12</sup> Kromě toho funguje jako endokrinní orgán, který vylučuje širokou škálu hormonů zapojených do regulace příjmu potravy, homeostázy glukózy, stimulace angiogeneze, zánětu a růstu vlasů.<sup>13</sup> Tloušťka hypodermis se liší podle různých částí těla a individuálních faktorů, jako je pohlaví, věk a množství tělesného tuku.<sup>8</sup>

**Dermis**, vnitřní vrstva kůže, se nachází pod epidermis a je klíčová pro udržení struktury a funkce pokožky. Tato elastická, ale pevná střední vrstva uchovává velký podíl tělesné vody a tlumí tělo před zraněním. Skládá se ze dvou dílčích vrstev – horní *stratum papillare*, která se skládá z volné pojivové tkáně a je vysoce vaskulární a spodní *stratum reticulare*, obsahující silně propojená vlákna kolagenu a elastinu, která dermis dodávají pevnost, pružnost a roztažnost.<sup>12</sup> Součástí dermis jsou kromě pojivové tkáně také krevní

a lymfatické cévy, které pak zajišťují výživu a odvod odpadních látek. V dermis se nacházejí vlasové folikuly, kde rostou chloupky, a potní žlázy, které produkují pot, jenž reguluje tělesnou teplotu skrze póry v epidermis. Mazové žlázy v dermis produkují maz, chrání vlasy a pokožku před bakteriemi a prachem.<sup>8</sup> Fibroblasty, hlavní buňky dermis, produkují proteiny jako kolagen a elastin, které tvoří kolagenové svazky, poskytující kůži pevnost a pružnost. Při hojení ran hraje zásadní roli fibronectin, který se také podílí na buněčné adhezi, růstu, migraci a buněčné diferenciaci.<sup>14</sup> Hydrataci a viskozitu pak naopak zajišťují proteoglykany, jako je kyselina hyaluronová. Dermis obsahuje také nervy, které vnímají bolest, dotyk a teplotu.<sup>12</sup> Imunitní funkce je zajišťována pomocí dermálních dendritických buněk, makrofágů, žírných buněk, eozinofilů, neutrofilů, B-lymfocytů a T-lymfocytů.<sup>12</sup> Dermis tedy hraje zásadní roli nejen v mechanické odolnosti kůže, její imunitní funkci, ale i v její funkci jako smyslového orgánu.<sup>8, 12</sup>

**Epidermis**, jako vnější vrstva, poskytuje ochrannou bariéru a je zodpovědná za obnovu povrchu kůže. Skládá se z pěti vrstev. Ta, co je nejhluběji a navazuje na dermis se nazývá *stratum basale*. Obsahuje mitoticky aktivní kmenové buňky, které produkují keratinocyty, a melanocyty, které syntetizují melanin. Na *stratum basale* nasedá *stratum spinosum*, známá jako vrstva ostnitých buněk, která obsahuje dendritické buňky a keratinocyty propojené desmozomy. *Stratum granulosum* se skládá z buněk obsahujících keratohyalinní a lamelární granule, které přispívají k buněčné soudržnosti. *Stratum lucidum* je tenká vrstva přítomná pouze v silnější kůži, jako jsou dlaně a chodidla. Nejvrchnější vrstva, SC, se skládá z mrtvých keratinocytů a keratinu, které tvoří ochrannou bariéru.<sup>7</sup> Podrobné složení epidermis včetně jejich vrstev můžeme vidět na obrázku 2.



Obrázek 2: Struktura epidermis<sup>12</sup>

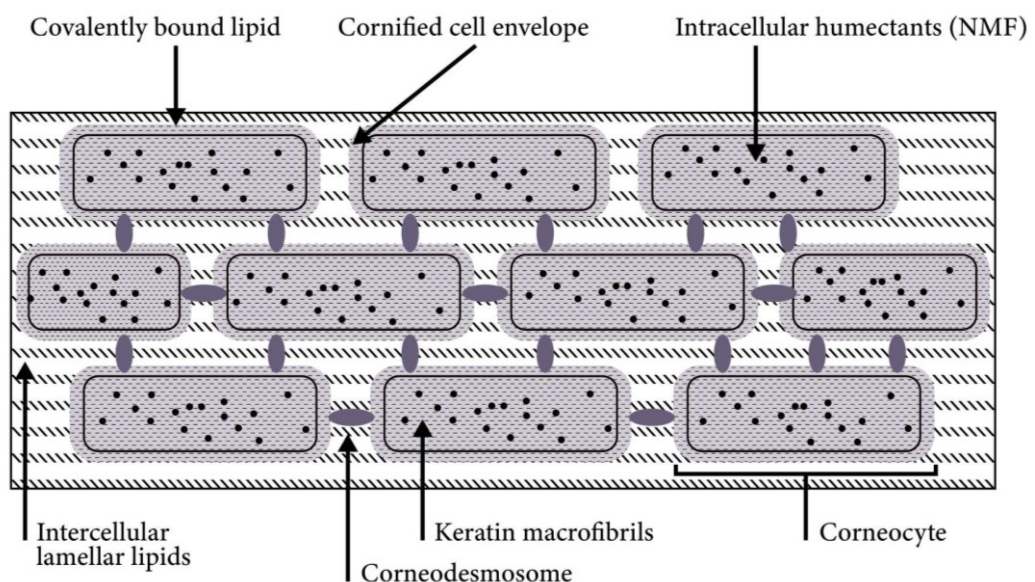


Epidermis je tvořena několika typy buněk. Keratinocyty, které dominují epidermis, produkují keratin a lipidy a tím zajišťují vodní bariéru kůže. Melanocyty, pocházející z buněk neurální lišty, syntetizují melanin, který chrání kůži před UV zářením. Langerhansovy buňky, dendritické buňky ve *stratum spinosum*, jsou klíčové pro imunitní obranu kůže.<sup>10</sup> Merkelovy buňky, nacházející se ve *stratum basale*, fungují jako mechanoreceptory pro lehký dotek a jsou koncentrovány v citlivých oblastech, jako jsou konečky prstů.<sup>15</sup>

Součástí kůže jsou také **deriváty epidermis**, mezi které řadíme přídatné části pokožky, které se vytvořily během prenatálního vývoje. Patří sem deriváty rohové (vlasy/chlupy a nehty) a deriváty žlázové (mazové a potní kožní žlázy, mléčná žláza).<sup>2</sup>

## 2.2 Stratum corneum

SC je nejsvrchnější vrstva kůže, která hraje klíčovou roli v ochraně proti vnějším vlivům a udržení hydratace. SC se skládá z korneocytů, zrohovatělých bezjaderných buněk bohatých na keratin, které jsou propojeny korneodesmosomy a obklopeny lipidovými lamelami.<sup>1,16</sup> (Obrázek 3)



Obrázek 3: Struktura rohové vrstvy tvořená souvislou vrstvou korneocytů, bohatých na proteiny (keratinová vlákna), které jsou propojeny korneodesmosomy a zapuštěny do mezibuněčné matrice obsahující nepolární lipidy, uspořádané do lamelárních lipidových vrstev<sup>17</sup>

Korneocyty, výsledné buňky diferenciaci keratinocytů, jsou obklopeny pevnou buněčnou obálkou zvanou korneocytální obálka, která je složena z kovalentně vázaných



proteinů a lipidů. Proteinová složka obalu, vytvořená specializovanými proteiny jako jsou involucrin, lorikrin a trichohyalin, přispívá k biomechanické odolnosti korneocytů. Lipidový obal, který nahrazuje původní plazmatickou membránu, je tvořen kovalentně vázanými  $\omega$ -hydroxylovanými ceramidy s velmi dlouhými řetězci mastných kyselin, což zajišťuje hydrofobní povlak buňky a vytváří spolu s extracelulárními nepolárními lipidy ochrannou matici.<sup>18</sup> Korneocyty, přirovnávané k „cihlám“ v cihlové zdi, jsou uspořádány do přibližně 18–21 vrstev a obklopeny mezibuněčnými lipidy, které fungují jako „malta“ a zajišťují nepropustnost kůže pro vodu a ochranu před vnějšími vlivy.<sup>3</sup> SC se skládá z 75–80 % proteinů, 5–15 % lipidů a zbytku organických sloučenin a vody. Proteiny jsou převážně tvořeny keratinem (okolo 70 %  $\alpha$ -keratinem a zhruba 10 %  $\beta$ -keratinem), zatímco lipidy tvoří lamely uspořádané do několika vrstev. Lipidové složky SC, tvořené především ceramidy (50 hm. %), cholesterolem (25 hm. %) a volnými mastnými kyselinami (10 hm. %), hrají zásadní roli v udržení integrity kožní bariéry.<sup>19</sup>

Filaggrin, klíčový protein přítomný v keratohyalinových granulích *stratum granulosum*, je v SC štěpen na monomery, které se podílejí na agregaci keratinových vláken do makrofibril, čímž přispívají ke zploštění a stabilizaci vnější vrstvy pokožky. Tento proces minimalizuje transepidermální ztrátu vody (TEWL) a vytváří důležitou strukturální bariéru proti pronikání alergenů a toxinů.<sup>18</sup> Monomery filaggrinu se na povrchu SC rozkládají na aminokyseliny, které tvoří přirozený zvlhčující faktor (NMF) – směs aminokyselin, laktátu a močoviny, jež udržují hydrataci, pružnost a správné pH pokožky, a chrání ji před UVB zářením. Snížená hladina filaggrinu, často způsobená mutacemi genu pro FLG, může vést k narušení kožní bariéry, zvýšené TEWL a snížené schopnosti zadržovat vodu. Tyto změny jsou spojovány s genetickými poruchami, jako je ichtyóza vulgaris a AD. Nedostatek filaggrinu také zvyšuje pH pokožky a narušuje lipidovou bariéru, což činí kůži náchylnější k zánětům a alergickým reakcím, nicméně deficit filaggrinu není vždy nutný pro vznik AD.<sup>3,20,21</sup>

### 2.2.1 Lipidy ve Stratum Corneum

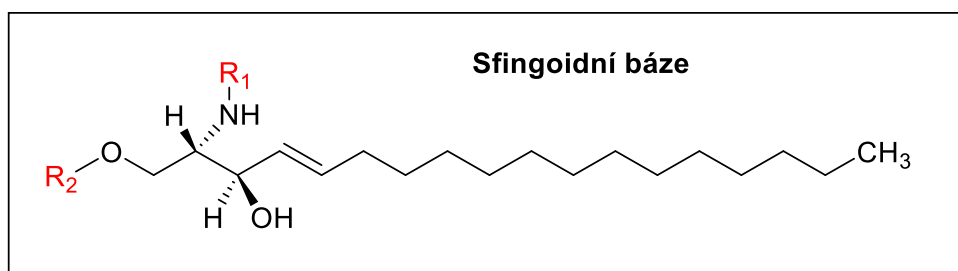
Ve SC jsou lipidy syntetizovány během epidermální diferenciace a následně uvolňovány do extracelulárních domén, kde vytvářejí lamelární lipidové vrstvy. Tyto lipidy jsou uspořádány do složitých mnohvrstevných lamel, zahrnující směs polárních i nepolárních lipidů, jako jsou sfingolipidy, cholesterol a volné mastné kyseliny. Jejich složení se může lišit podle druhu, oblasti těla a stupně diferenciace keratinocytů.

Mezibuněčné lipidy snižují ztrátu vody (TEWL), ale také regulují deskvamaci. Jakékoli změny v jejich struktuře nebo složení mohou vážně narušit tyto klíčové ochranné funkce pokožky.<sup>22, 23</sup> Pokud dojde k jejich abnormálnímu metabolismu, může to vést k zánětu. Metabolismus volných mastných kyselin může aktivovat receptor PPAR, což ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk. Ceramidy zase fungují jako signální molekuly, které aktivují procesy v epidermálních buňkách. Nedostatek steroidní sulfatázy způsobuje hromadění cholesterolsulfátu, což narušuje soudržnost buněk a vede k recesivní X-vázané ichthyóze.<sup>16</sup>

V nižších vrstvách epidermis dominují membránové lipidy, jako jsou fosfolipidy, zatímco v horních vrstvách SC se nacházejí především ceramidy, cholesterol a volné mastné kyseliny. Nezbytnou součástí pro udržení správné funkce epidermální bariéry a pro udržení lamelárních struktur jsou esenciální mastné kyseliny. Tyto kyseliny jsou získávány z vnějších zdrojů, protože keratinocyty neexprimují protein vázající mastné kyseliny s nízkou molekulovou hmotností, který je běžný u jiných buněk aktivních v lipidovém metabolismu.<sup>22</sup>

## 2.2.2 Sfingolipidy

Sfingolipidy tvoří rozsáhlou a rozmanitou skupinu komplexních membránových lipidů, které jsou základními stavebními kameny plazmatických a organelových membrán téměř všech eukaryotických buněk. Jejich struktura vychází z derivátů sfingoidní báze (Obrázek 4), což je nejčastěji *D-erythro-2-aminooktadekan-1,3 diol*. Sfingolipidy se skládají z mastné kyseliny, která je připojena ke sfingoidní bázi amidovou vazbou, čímž vzniká ceramid – základní struktura většiny sfingolipidů.<sup>24</sup> Kromě mastné kyseliny může být ke sfingoidní bázi připojena i další hlavní skupina, která se může lišit od jednoduchého vodíku až po složitější molekuly, jako je fosfocholinová skupina sfingomyelinu, cukerná složka cerebrosidů či oligosacharidový zbytek gangliosidů, ke které mu je připojena sialová kyselina (Tabulka 1).<sup>25</sup>



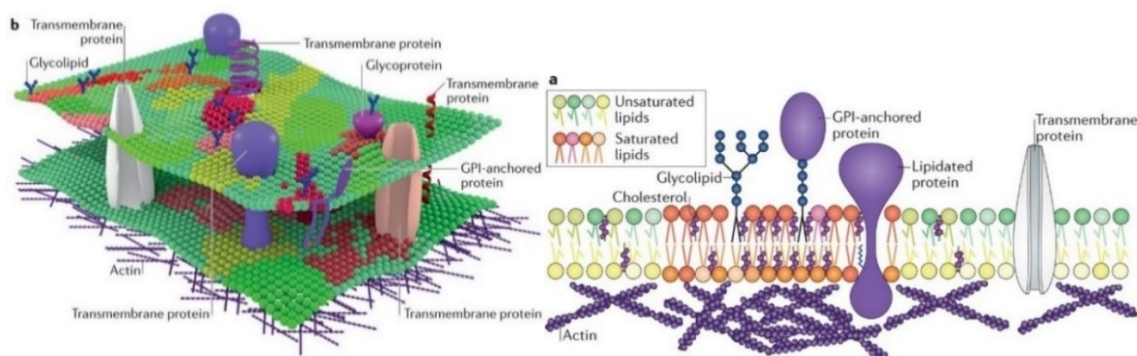
Obrázek 4: základní struktura sfingoidních bází

Tabulka 1: Struktura běžných tříd sfingolipidů od jednoduchého sfingosinu až po složený gangliosid.

Sfingolipid	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Sfingosin	H	H
Ceramid	mastná kyselina	H
Sfingomyelin	mastná kyselina	fosfocholin
Cerebrosid	mastná kyselina	glukóza/galaktóza
Sulfatid	mastná kyselina	SO <sub>3</sub> -galaktóza
Gangliosid	mastná kyselina	oligosacharid ± sialová kys.

Sfingolipidy jsou přítomny ve všech živočišných, rostlinných a houbových buňkách, a dokonce i v některých prokaryotických organismech a virech. Jejich základní funkcí je tvořit strukturu membrán, lipoproteinů, kůže a dalších biomateriálů, ale také fungují jako modulátory a mediátory buněčné signalizace.<sup>25</sup> Mezi klíčové bioaktivní sfingolipidy patří ceramid a sfingosin-1-fosfát (S1P), které mají zásadní vliv na regulaci přežití a smrti buněk. Tyto molekuly vykazují protichůdné účinky – ceramid je známý svou schopností indukovat apoptózu (programovanou buněčnou smrt), zatímco S1P podporuje přežití buněk. Tento dynamický vztah je zvláště důležitý v kontextu rakoviny, kde ceramid a S1P hrají roli v regulaci růstu nádoru a odpovědi na protinádorovou terapii.<sup>26</sup>

Sfingolipidy se často sdružují s dalšími sfingolipidy, glykolipidy, cholesterolem a specifickými proteiny, čímž vytvářejí specializované membránové domény nazývané lipidové rafty (Obrázek 5). Tyto rafty jsou klíčové pro regulaci důležitých buněčných procesů, včetně růstu, apoptózy a přenosu signálů. Jejich přítomnost a funkce jsou zásadní pro udržení správné buněčné funkce a integrity.<sup>25,27</sup>

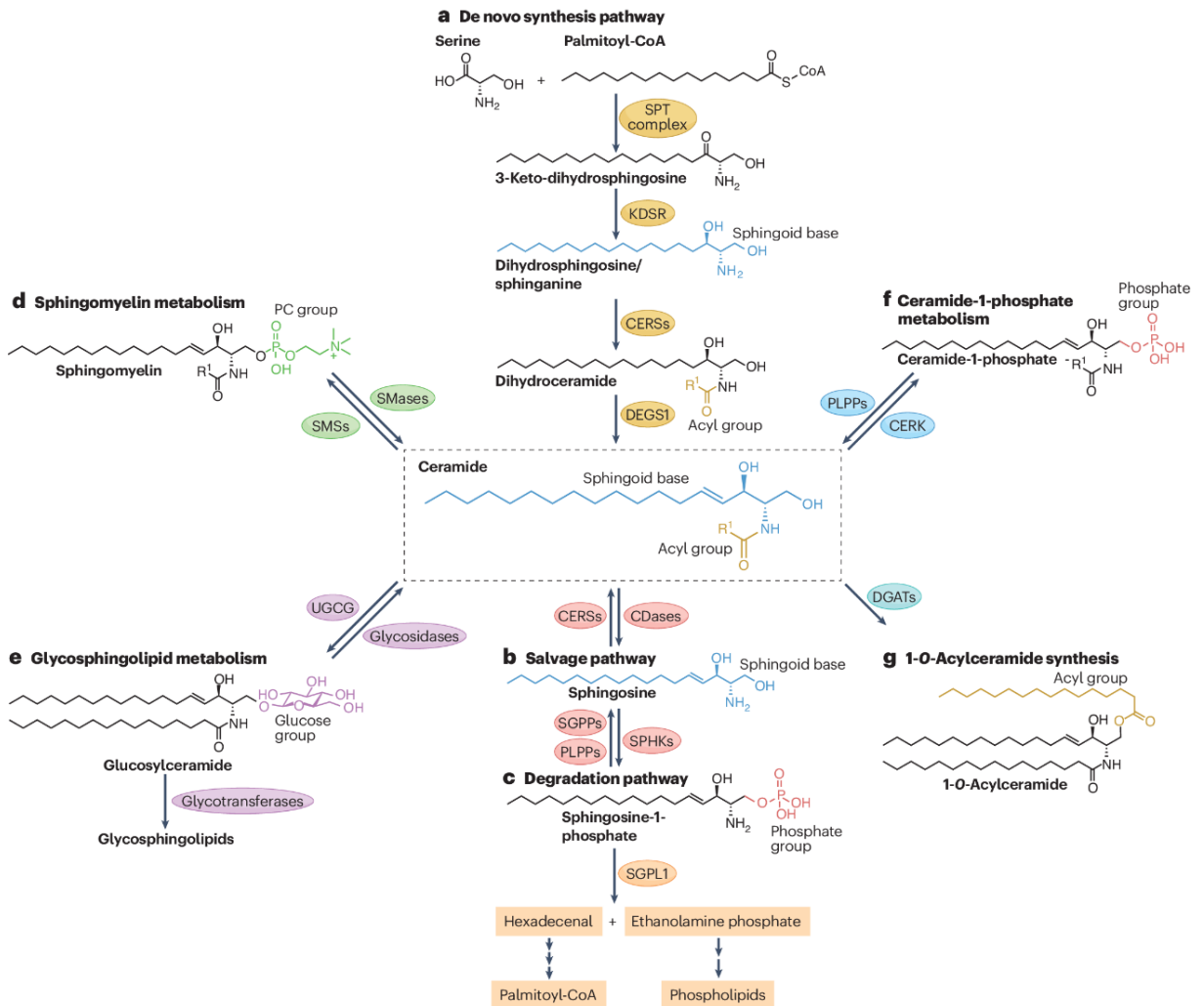


Obrázek 5: Struktura membránového raftu

GPI-anchored protein - protein ukotvený glykosylfosfatidylinositolem (GPI)<sup>27</sup>

## Metabolismus sfingolipidů

Metabolismus sfingolipidů je složitý proces, který zahrnuje jak jejich syntézu, tak i jejich degradaci a recyklaci, a je zásadní pro funkci buněčných a subcelulárních membrán.<sup>28</sup> Je regulován prostřednictvím nejrůznějších enzymů, kterých je u savců přibližně 40.<sup>29</sup>



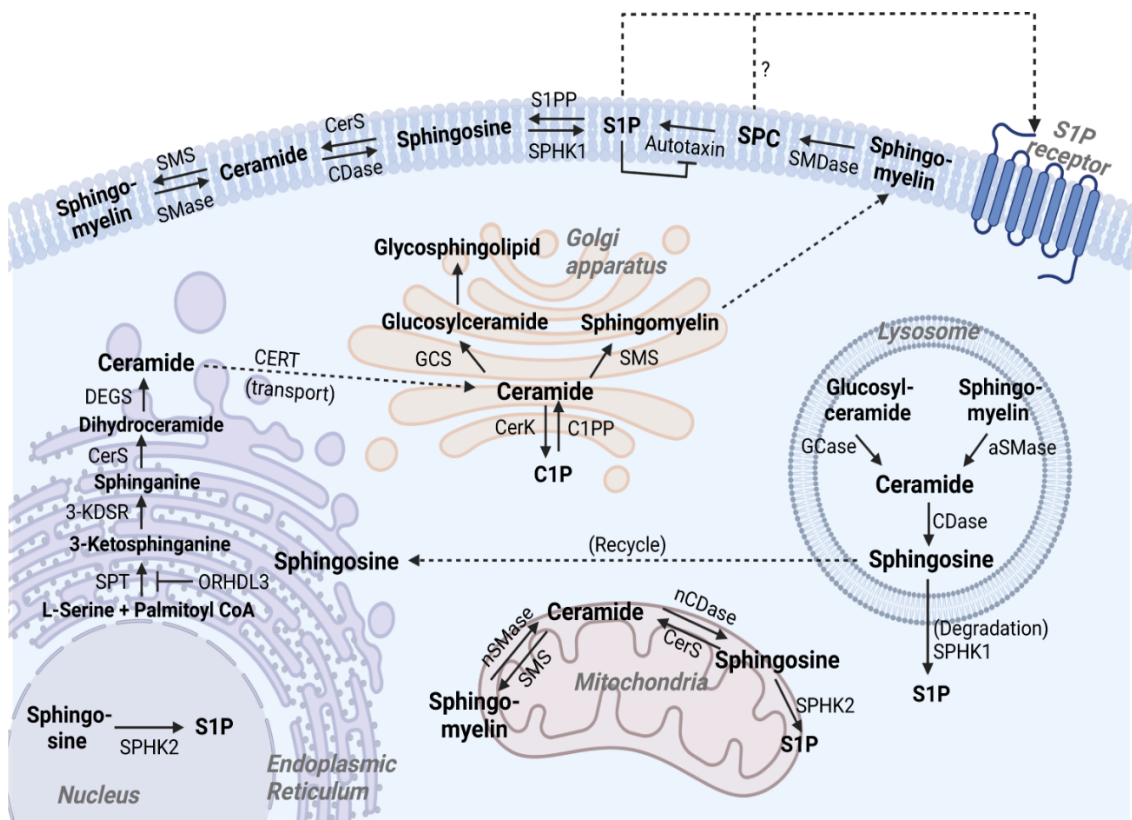
Obrázek 6: Cesty metabolismu sfingolipidů - Základní koncepce metabolicky propojených drah<sup>30</sup>

Sfingolipidy mohou být syntetizovány *de novo* v rámci dráhy, která začíná kondenzací aminokyseliny L-serinu s acyl-CoA za katalytického působení serin palmitoyl transferázy (SPT) v endoplazmatickém retikulu. Jako výhodné substráty se jeví serin a palmitoyl-CoA, ale lze také použít alanin nebo glycin a stearát nebo myristát.<sup>29</sup> Produktem této reakce je 3-ketodihydrosphingosin. Tento proces pokračuje sérií dalších reakcí, zahrnujících redukcí 3-ketodihydrosphingosinu, která je katalyzovaná 3-ketodihydrosphingosin reduktázou (3-KDSR), vzniká dihydrosphingosin nebo-li sfinganin. Následuje působení ceramid syntázy (CerS) za vzniku dihydroceramidu a pak

dihydroceramid desaturázy (DES), která vede ke vzniku ceramidů, případně fytoceramidů (Obrázek 6 - a).<sup>31</sup> Syntéza ceramidů může být indukována v reakci na metabolickou zátěž, například při zvýšené koncentraci serinu nebo palmitátu.<sup>32</sup>

Ceramidy jsou pak inkorporovány do různých komplexních sfingolipidů (převážně v Golgiho aparátu) prostřednictvím modifikací v poloze 1 sfingosinu za vzniku ceramid-1-fosfátu (C1P), sfingomyelinu nebo glykoceramidů, které zase slouží jako prekurzory pro různé složitější glykosfingolipidy (Obrázek 6 - d, e, f). Sfingomyelinázy, enzymy aktivované například působením TNF- $\alpha$ , Fas ligandu nebo oxidativním stresem, mohou hydrolyzovat sfingomyelin za vzniku ceramidu a fosfocholinu.<sup>32</sup>

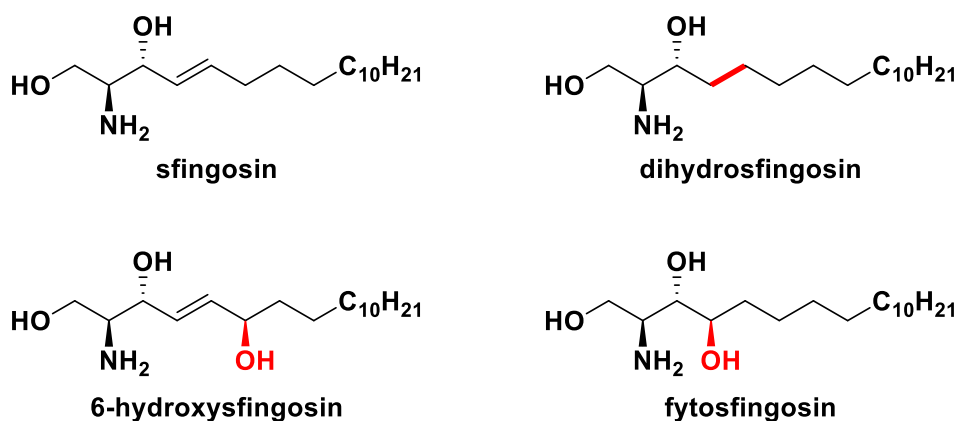
Katabolismus sfingolipidů probíhá v lysozomech, kde se sfingomyelin, C1P a glykosfingolipidy hydrolyzují na ceramid. Tento ceramid může být následně deacylován na sfingosin pomocí enzymu ceramidázy, který je dále fosforylován sfingosin kinázou na S1P. (Obrázek 6 - b) S1P je pak degradován S1P lyázou na mastný aldehyd a ethanolaminofosfát, což vede k produkci palmitoyl-CoA (Obrázek 6 - c).<sup>29</sup> Syntéza a degradace sfingolipidů na buněčné úrovni je zobrazena na obrázku 7.



Obrázek 7: Syntéza a degradace sfingolipidů na buněčné úrovni; Sfingolipidy, které jsou klíčovými složkami buněčných a subcelulárních membrán, mohou být syntetizovány prostřednictvím sérií enzymatických reakcí v rámci de novo dráhy. Kromě toho mohou být degradovány ze sfingomyelinu a ceramidu na menší sfingolipidy prostřednictvím záchranné dráhy (salvage pathway). Tyto menší sfingolipidy pak fungují jako signální molekuly, jejichž role a funkce se přizpůsobují specifickému prostředí a podmínkám.<sup>28</sup>

### 2.2.3 Sfingoidní báze

Sfingoidní báze jsou základními stavebními bloky sfingolipidů a představují alifatické aminoalkoholy s dlouhým řetězcem, obvykle obsahující 18 uhlíků. V kožní bariéře se nacházejí čtyři základní sfingoidní báze: **sfingosin**, **dihydrosfingosin**, **fytosfingosin** a **6-hydroxysfingosin**, které mají společnou základní kostru, ale liší se přítomností dvojných vazeb a hydroxylových skupin.<sup>33</sup> (Obrázek 8).



Obrázek 8: Sfingosin a jeho strukturální obměny

Sfingosin, jedna z hlavních sfingoidních bází, má schopnost indukovat tvorbu kanálů v membránách. Při vysokých koncentracích může být zachycen v kyselém prostředí lyzozomů. Derivát sfingosinu S1P je rozpustný ve vodě a hraje důležitou roli v buněčné signalizaci. Manipulace se S1P může být složitá kvůli jeho povaze jako obojetného iontu. Vysoké koncentrace S1P v krvi, přibližně 1 μM, jsou spojeny s lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL), které jsou klíčové pro transport lipidů v těle a mají významnou roli v ochraně proti kardiovaskulárním onemocněním.<sup>34</sup>

Sfingosin a dihydrosfingosin se vyskytují ve všech eukaryotických buňkách, zatímco fytosfingosin je specifický pro určité druhy tkání. Nejnověji popsany 6-hydroxysfingosin se vyskytuje výhradně v epidermis. Tyto sfingoidní báze jsou nejen klíčové pro strukturu a funkci buněčných membrán, ale také hrají významnou roli v biologických procesech, jako je udržování kožní bariéry, buněčná signalizace a apoptóza.<sup>33</sup> V rakovinných buňkách může být zvýšení hladiny sfingosinu vyvoláno environmentálním stresem, chemoterapeutickou léčbou nebo apoptotickými stimuly, což nakonec vede k apoptóze. K tomu, aby se v buňce spustil tento proces, může dojít také vlivem podávání exogenního sfingosinu nebo inhibicí sfingosin kinázy (SK), což rovněž vede ke zvýšení hladiny sfingosinu. Při poškození DNA dochází také ke zvýšení hladiny sfingosinu, což přispívá k zastavení buněčného cyklu. Tento účinek je dále podpořen upregulací enzymu alkalická ceramidáza 2 (ACER2) nebo exogenním podáním



sfiningosinu. V procesu buněčné diferenciaci hraje sfiningosin významnou roli prostřednictvím upregulace enzymů alkalické ceramidázy 1 (ACER1) a kyselá ceramidázy (ACDázy) v lidských epidermálních keratinocytech. I v tomto případě může být diferenciaci podpořena exogenním sfiningosinem. Sfiningosin je tak zásadní molekulou v regulaci těchto důležitých buněčných funkcí.<sup>29</sup>

Sfingoidní báze vykazují výraznou antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru bakterií, virů a hub.<sup>35</sup> Zejména sfiningosin a dihydrosfingosin (sfinganin) jsou známé svou schopností působit proti gram pozitivním a gram negativním bakteriím i *C. albicans*. Po ošetření sfingoidními bázemi dochází ke strukturálnímu poškození mikroorganismů, které se podobá účinkům antibiotik, jako je narušení buněčné stěny, perforace membrány a úniku buněčného obsahu.<sup>36</sup> Nedávné studie naznačují, že sfiningosin a fytosfingosin mohou být použity k prevenci tvorby bakteriálního biofilmu na lékařských zařízeních. Potažení plastových zdravotnických prostředků sfiningosinem nebo fytosfingosinem poskytuje ochranu proti adhezenci bakterií, jejich růstu a následné infekci.<sup>37</sup> Ačkoli v lidské kůži nebyl zatím fytosfingosin ve volné formě detekován, má rovněž antibakteriální aktivitu.<sup>35</sup>

## 2.2.4 Ceramidy

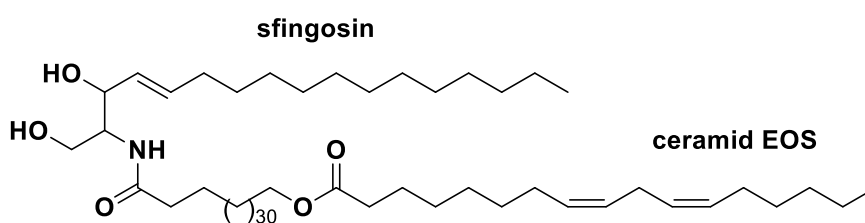
Ceramidy jsou podtřídou sfingolipidů a jsou přítomny ve všech tkáních lidského těla. Jejich největší rozmanitost je v lidské kůži, konkrétně v SC.<sup>38</sup> V této vrstvě jsou ceramidy hlavními nepolárními lipidy a hrají klíčovou roli v udržování kožní bariéry, buněčné adhezi a diferenciaci epidermis.<sup>39</sup> Díky své bioaktivitě regulují ceramidy důležité buněčné procesy, včetně proliferace, diferenciaci a apoptózy. Mohou ovlivňovat zastavení buněčného cyklu, stárnutí a stresové reakce. Tvorba ceramidů může být stimulována různými faktory, jako jsou tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), tepelný stres, oxidační stres, ionizující záření a chemoterapeutika.<sup>32,40</sup>

Základní struktura epidermálních ceramidů se skládá ze sfingoidní báze a mastné kyseliny, která je k ní připojena amidickou vazbou. Mastné kyseliny v ceramidech obvykle mají délku řetězce 24 uhlíků a mohou být nesubstituované nebo obsahovat  $\alpha$ - či  $\omega$ -hydroxylové skupiny.<sup>19</sup>

Existují čtyři typy sfingoidních bází (sfiningosin [S], 6-hydroxysfingosin [H], dihydrosfingosin [DS] a fytosfingosin [P]) a čtyři typy mastných kyselin (esterifikované  $\omega$ -hydroxylované [EO],  $\omega$ -hydroxylované [O],  $\alpha$ -hydroxylované [A] a nehydroxylované [N]). Jejich vzájemné kombinace vytvářejí 16 různých tříd ceramidů, které byly identifikovány ve SC. Druhy ceramidů se odlišují délkou mastné kyseliny nebo sfingoidní

báze.<sup>38, 41</sup> Pokud jsou zváženy všechny možné kombinace, lze uvést následující třídy ceramidů: CER[NDS], CER[NS], CER[NP], CER[NH], CER[ADS], CER[AS], CER[AP], CER[AH], CER[ODS], CER[OS], CER[OP], CER[OH], CER[EODS], CER[EOS], CER[EOP] a CER[EOH].<sup>38</sup>

Zvláště významné jsou ty ceramidy, kde je sfingosin (nebo jeho derivát) vázán na  $\omega$ -hydroxykyselinu s řetězcem o délce 30–34 uhlíků, jejíž hydroxylová skupina je esterifikována kyselinou linolovou. Tento typ ceramidů vytváří základ, kolem kterého se organizují další ceramidy, obsahující mastné kyseliny s délkou řetězce 20–24 uhlíků (Obrázek 9).<sup>19</sup>



Obrázek 9: Příklad molekuly ceramidu – konkrétně ceramidu EOS, tvořící základ lipidových lamel v SC

Strukturní složitost kožních ceramidů je dána variacemi v délce uhlíkového řetězce, různými stupni nasycení, hydroxylací a dokonce i metylovým rozvětvením. Pro syntézu ceramidů jsou mastné kyseliny (FA) nejprve aktivovány koenzymem A a následně syntetizovány cytosolovou syntázou mastných kyselin (FAS) až do délky 16 uhlíkových atomů. Další elongace mastných kyselin probíhá v endoplazmatickém retikulu prostřednictvím 2-uhlíkových kroků, které zahrnují čtyři fáze: prodloužení acylového řetězce, redukci, dehydrataci a další redukční krok. Rychlost tohoto procesu je regulována syntézou 3-ketoacyl-CoA syntázami, rodinou sedmi enzymů známou jako ELOVL1–7, které prodlužují mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem.<sup>42,43</sup>

Dominujícími mastnými kyselinami ve SC jsou kyselina behenová (C22) a lignocerová (C24), s menším zastoupením kyselina palmitová a stearová.<sup>19</sup> Ceramidy s koncovou  $\omega$ -hydroxylovou skupinou se kovalentně váží na proteiny korneocytární obálky, zejména involucrin, čímž vzniká první lamela lipidů na povrchu korneocytů, na kterou navazují další lamely volných lipidů SC. Snížení hladiny ceramidů ve SC může vést k poruše kožní bariéry, ztrátě vody a zvýšené náchylnosti k antigenům, což může vyústit v různá kožní onemocnění.<sup>44</sup>

## 2.2.5 Komplexní sfingolipidy

Komplexní sfingolipidy zahrnují sfingomyeliny, cerebrosidy a gangliosidy, hrající klíčovou roli v buněčných membránách a nervovém systému.



Sfingomyeliny jsou jedním z nejrozšířenějších sfingolipidů a vyskytují se napříč různými organismy. Jsou nezbytnou součástí buněčných membrán, kde spolu s cholesterolem a glykosfingolipidy tvoří lipidové rafty. Sfingomyeliny jsou také významně zastoupeny v myelinové pochvě nervových vláken, kde zajišťují izolaci a ochranu neuronů, což je klíčové pro správný přenos nervových impulsů. Z chemického hlediska se SM skládají ze sfingoidní báze, *N*-acylového řetězce a fosfocholinu. Tyto molekuly mohou podléhat různým modifikacím, jako je desaturace, hydroxylace nebo methylové větvení, což umožňuje vznik různých variant SM přizpůsobených specifickým typům tkání. Syntéza sfingomyelinů probíhá v Golgiho aparátu, kde enzym sfingomyelin syntáza (SMS) katalyzuje připojení fosfocholinu na C1-hydroxylovou skupinu ceramidu. Metabolismus sfingomyelinů je přísně regulován enzymy, které se podílejí na jejich syntéze a degradaci, což má význam pro udržení buněčné homeostázy. Dysregulace tohoto metabolismu může vést k patologickým stavům, včetně neurodegenerativních onemocnění.<sup>45</sup>

Cerebrosidy jsou typem glykosfingolipidů, které obsahují pouze jeden monosacharidový zbytek v jejich hlavní struktuře. Jsou převážně neutrální, a mohou tvořit micely a membránové struktury. Jejich hlavním představitelem je galaktocerebrosid (GalCer), který je běžný v lidském mozku. Sulfatovaná forma cerebrosidů nebo-li sulfatidy jsou 3-*O*-sulfatované GalCer a nesou záporný náboj, což ovlivňuje jejich chování v buněčných membránách a nervové tkáni<sup>46, 47</sup>

Gangliosidy představují složitější skupinu sfingolipidů, které obsahují alespoň jeden zbytek kyseliny sialové (Sia), což jim propůjčuje negativní náboj a umožňuje jim interagovat s různými buněčnými proteiny a receptory. Jsou důležité zvláště v nervové tkáni, kde se podílejí na myelinizaci a přenosu signálů.<sup>47</sup> Gangliosidy mohou sloužit jako receptory pro bakteriální toxiny a hrají roli v řadě lidských onemocnění, včetně rakoviny a metabolických poruch. Jejich nedostatek nebo narušení metabolismu vede k hromadění těchto lipidů, což způsobuje závažné onemocnění jako gangliosidózu nebo Tay-Sachsovu chorobu.<sup>48</sup>

## 2.3 Syntetické postupy přípravy sfingosinu

Rozmanité biologické role sfingolipidů vedly k intenzivnímu rozvoji jejich chemické syntézy. Hlavními složkami v biosyntetických drahách savců jsou sfingosin, S1P, ceramidy, sfingosinfosforylcholinu (SPC), sfingomyelin a glykosfingolipidy. Vzhledem k tomu, že sfingosin je základním stavebním blokem mnoha z těchto lipidů, není překvapivé, že většina z nich je syntetizována z chráněných forem sfingosinu.<sup>49</sup>

Vzhledem k tomu, že sfingosin není snadné získat z přírodních zdrojů v homogenní formě, byl jeho výzkum zaměřen na vývoj jednoduchých a nákladově efektivních syntetických metod.<sup>50</sup> První úplné chemické syntézy sfingosinu a sfingomyelinu popsal Shapiro a kol. Tato klasická metoda zahrnuje Knoevenagelovu kondenzaci kyseliny malonové s myristaldehydem za vzniku kyseliny *trans*-2-hexadecenové, která je několika kroky přeměněna na 3-O-benzoyl-dl-sfingosin.<sup>51</sup> Od této syntézy bylo v literatuře publikováno mnoho syntéz sfingosinu a jeho derivátů, přičemž každá nabízí něco jedinečného. Sfingosin ve své molekule obsahuje dvojnou vazbu s uspořádáním *trans*. Díky dvěma stereogenním centřům můžeme využít jako výchozí sloučeniny chirální látky, jako jsou **L-serin**, **sacharidy** nebo **jiné chirální látky**. Mezi ty můžeme zařadit například kyselinu vinnou, 1,3-dioxam nebo fytosfingosin. *Trans*-dvojná vazba může být vytvořena například Wittigovou reakcí, Juliovou olefinací, křížovou metatezí olefinů a nebo alkylnací, po které následuje selektivní redukce trojné vazby.<sup>50</sup>

➔ **Příklady známých chemických syntéz sfingosinu:**

1. Pomocí *E*-selektivní křížové metateze olefinů za použití D- glukózy a koncového alkenu s dlouhým řetězcem byly syntetizovány *D-erythro*- a *D-threo*-sfingosin (Schéma 1). Jde o olefinaci dvou terminálních alkenových sloučenin. Výhody této reakce jsou vysoká *E*-selektivita s dobrým výtěžkem (65 %) při tvorbě produktu a tolerance funkčních skupin a rozumná stabilita Grubbsova katalyzátoru v přítomnosti aminodiolové funkční skupiny.<sup>52</sup>

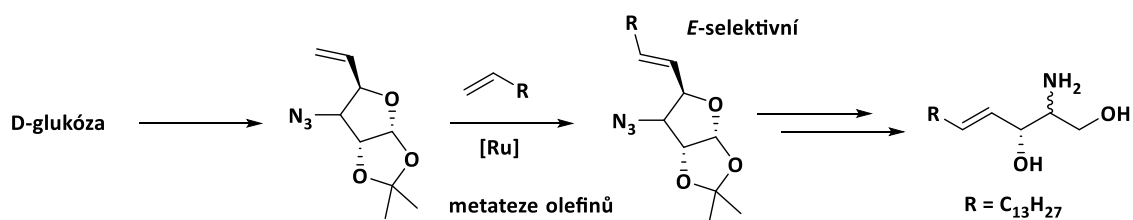


Schéma 1: *E*-selektivní křížové metateze olefinů podle V. D. Chaudahriho a kol. (2005)

2. Krátká a praktická syntéza *D-erythro*-sfingosinu vycházející z vinylooxidu byla posána S. Torsellem a P. Somfaiem (2004) (Schéma 2). Mezi klíčové kroky patří regioselektivní otevření vinylooxidu a *E*-selektivní křížová metateze, které vedou k dosažení cílové molekuly v pěti krocích s celkovým výtěžkem 51 %.<sup>53</sup>

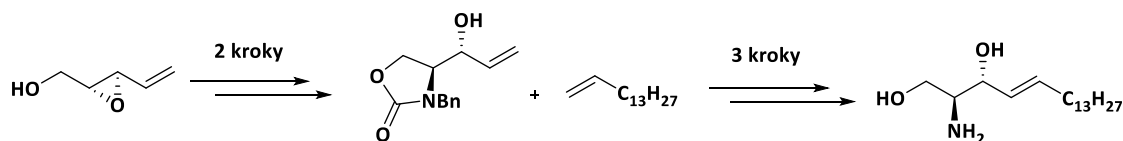


Schéma 2: regioselektivní otevření vinylooxidu a *E*-selektivní křížová metateze podle S. Torsella a P. Somfaia (2004)

3. V roce 1994 T. Murakami a jeho kolegové připravili *D-erythro*-sfingosin (**1**) a fytosfingosin (**2**) z *D*-glukosaminu (**3**) tím, že využili celý jeho uhlíkový skelet a funkční skupiny (Schéma 3). V této syntetické cestě byla provedena regioselektivní alkylace epoxy-tosylátu pomocí Grignardova činidla za katalýzy mědi, čímž vznikl klíčový meziprodukt **10**. Tento meziprodukt byl následně přeměněn na sloučeniny **1** a **2** prostřednictvím regioselektivní tvorby jodhydrinu **11**.<sup>54</sup>

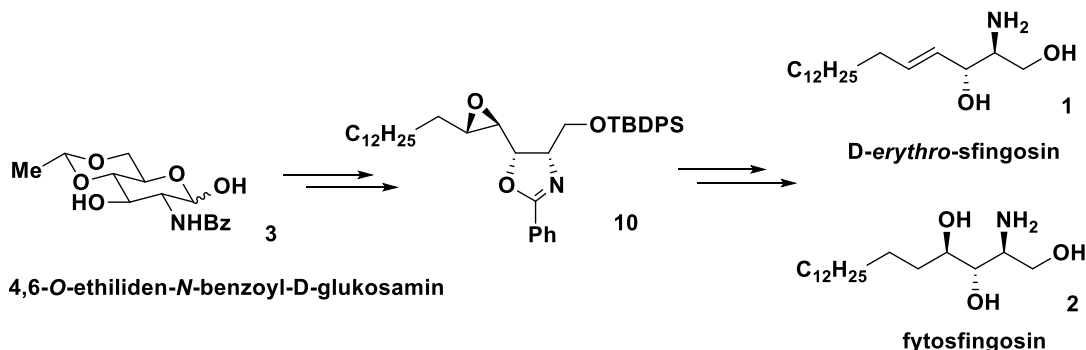


Schéma 3: regioselektivní alkylace epoxy-tosylátu pomocí Grignardova činidla s následnou přeměnou prostřednictvím regioselektivní tvorby jodhydrinu

4. Stereoselektivní syntéza všech čtyř enantiomerů sfingosinu (Schéma 4) vychází buď z *L*- nebo *D*-serinu. Klíčovými kroky této syntézy jsou diastereoselektivní adice 1-lithiopentadecynu na aldehyd a Mitsunobuova inverze propargylalkoholu. Přidání 1-lithiopentadecynu k níže uvedenému aldehydu probíhá s vysokou *erythro* selektivitou. Na základě tohoto pozorování byla vyvinuta stereoselektivní metoda pro syntézu každého z enantiomerů sfingosinu.<sup>55</sup>

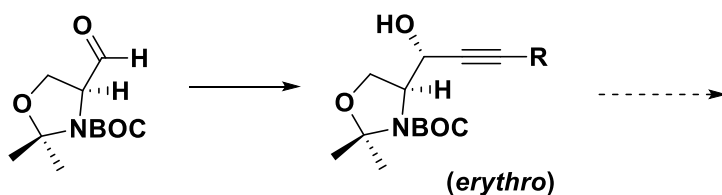


Schéma 4: Stereoselektivní syntéza všech čtyř enantiomerů sfingosinu podle Nimkara, S., a kol. (1998)

5. Syntéza *D-erythro*-sfingosinu podle Schmidta a Zimmermana (1986) vychází z *D*-galaktózy prostřednictvím univerzálního meziproduktu 2,4-di-*O*-chráněné *D*-threózy. Tato syntéza zahrnuje *trans*-selektivní Wittigovu reakci, zavedení azidové skupiny na nechráněnou hydroxylovou skupinu a následnou redukci azidu.<sup>56</sup>
6. Chirospecifická metoda vycházející z *D*-galaktózy přes azidosfingosinový meziprodukt umožňuje připravit vysoce homogenní sfingosinovou bázi s čistotou vyšší než 99,9 %. V této studii byly připraveny tři - *D-erythro*-sfingosin, *N*-palmitoylsfingosin (ceramid) a glukosylceramid (cerebrosid). Použitím Mosherovy

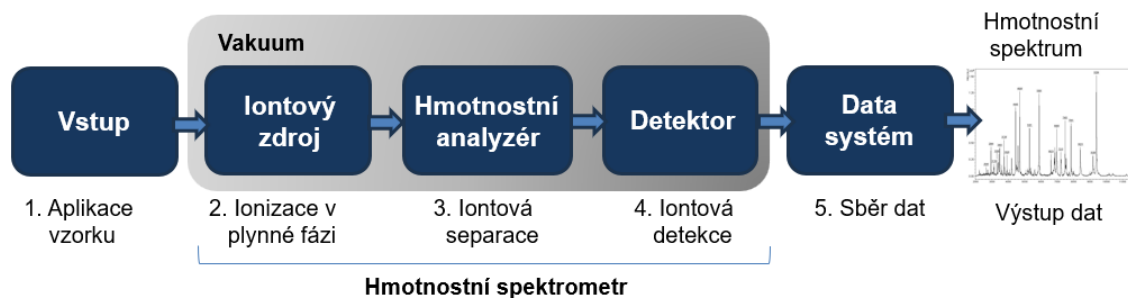
kyseliny bylo prokázáno, že tato báze je opticky čistá. Z tohoto sfingosinu byl následně připraven dvěma různými způsoby ceramid s vysoce homogenní palmitovou kyselinou (99,8 % C16:0). Dalším sfingolipidem v této sérii byl cerebrosid glukosylceramid, který byl syntetizován ve vysoce homogenní formě. Tyto tři sfingolipidy jsou v současnosti využívány pro biofyzikální studie jejich hydratovaných biomolekulárních struktur.<sup>57</sup>

## 2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která umožňuje identifikovat neznámé látky, určit jejich molekulovou hmotnost, prvkové složení a v mnoha případech i jejich strukturu. Podle studovaných látek dělíme hmotnostní spektrometrii na atomovou a molekulovou.<sup>58</sup> Princip hmotnostní spektrometrie spočívá v interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem.<sup>59</sup> Molekuly analyzovaného vzorku jsou nejprve ionizovány, což znamená, že jim je dodána energie, která je přeměněna na nabitě částice. Tyto ionty jsou následně separovány na základě poměru jejich hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) a poté dopadají na převodník, který je přeměněn na elektrický signál. Separace iontů se provádí pomocí statických či dynamických elektrických nebo magnetických polí, ale i v oblastech bez pole, a to za předpokladu, že mají ionty dobře definovanou kinetickou energii na vstupu do dráhy letu. Ionty s různými hodnotami  $m/z$  mohou být detekovány buď postupně, nebo současně, pokud je použit multikanálový detektor. Výsledkem je vynesení v grafu jako závislost zastoupení iontů na poměru jejich hmotnosti a náboje, které se označuje jako hmotnostní spektrum.<sup>58,59, 60</sup>

### 2.4.1 Základní vlastnosti hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr je složité zařízení využívané ve fyzikálně-chemické analýze, které umožňuje přesnou identifikaci a kvantifikaci chemických sloučenin na základě jejich hmotnosti a náboje. Tento přístroj se skládá ze tří hlavních komponent: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Společně umožňují efektivní analýzu vzorků a pracují za podmínek hlubokého vakua. Na zadní část stroje lze připojit datový systém, který sbírá a zpracovává data z detektoru.<sup>58</sup> Při analýze vzorku sice dochází k jeho spotřebě, ale velmi minimální a výhodou této metody je možnost identifikace i nanogramového množství vzorku.<sup>60</sup>



Obrázek 10: Základní schéma hmotnostního spektrometru

Iontový zdroj je první a nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru, kde se analyzovaná látka převádí do iontové formy, což je klíčové pro jejich následnou analýzu. Existují různé typy iontových zdrojů, které lze rozdělit na „tvrdé“ a „měkké“ na základě množství energie dodané při ionizaci. Tvrdé ionizační techniky, jako je elektronová ionizace (EI), poskytují bohatá fragmentační spektra, což umožňuje přesnou identifikaci látek, avšak může vést k úplnému rozpadu molekulového iontu, což komplikuje určení molekulové hmotnosti. Měkké ionizační techniky, jako je chemická ionizace nebo elektrosprej (ESI), generují méně fragmentů, což je výhodné pro zachování molekulového iontu a tím i pro stanovení molekulové hmotnosti. EI je klasická metoda, při které elektrony s vysokou energií interagují s molekulami analytu, což vede k tvorbě kladně nabitých radikálových iontů. Tento proces je vhodný pro těkavé látky a často se používá v kombinaci s plynovou chromatografií (GC/MS). ESI je měkká ionizační technika, která se hojně používá při analýze biologických vzorků. Funguje na principu tvorby nabitých kapiček aerosolu, které jsou vystaveny elektrickému poli a následně se odpařují, čímž se z nich uvolňují ionty. **MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)** je další měkká ionizační technika, která využívá laserový puls k desorpci a k ionizaci molekul smíchaných s matricí, což je vhodné pro analýzu makromolekul, jako jsou proteiny.<sup>59, 61</sup>

Hmotnostní analyzátor je část spektrometru, kde dochází k separaci iontů na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). Existuje několik typů analyzátorů: **Kvadrupólový analyzátor**, který je jedním z nejrozšířenějších a funguje na principu řízeného elektrického pole, které umožňuje separaci iontů s určitou hodnotou  $m/z$ . Kvadrupólové analyzátoři mohou pracovat ve dvou režimech – skenování všech iontů (skenovací režim) nebo selektivní detekci předem vybraných iontů (SIM režim). Druhým typem je **průletový analyzátor** (TOF, Time of Flight), který měří dobu letu iontů v trubici pod vakuem. Ionty s nižší hmotností a stejným nábojem doletí k detektoru rychleji než ionty s vyšší hmotností. Dalším typem analyzátoru je **trojitý kvadrupól** a **Tandemové uspořádání analyzátorů** (MS/MS). To umožňuje fragmentaci vybraných iontů v kolizní

cele a následnou analýzu těchto fragmentů, což zvyšuje selektivitu a citlivost analýzy. Kombinace analyzátorů, jako je trojitý kvadrupól (QqQ), umožňuje provádět komplexní fragmentační experimenty a kvantitativní analýzy s vysokou přesností.<sup>60, 61</sup>

Detektory jsou součástí, která zaznamenává ionty vybrané analyzátozem a převádí tento signál na digitální data. Existují dva hlavní typy detektorů: **Elektronové násobiče** a **Detektory schopné měřit m/z**. Elektronové násobiče zaznamenávají všechny ionty bez ohledu na jejich m/z hodnotu a amplifikují signál pomocí sady dynod. **Detektory schopné měřit m/z** (např. iontově cyklotronová rezonance nebo orbitrap) zaznamenávají ionty na základě jejich m/z poměru a využívají Fourierovu transformaci pro zpracování signálu.<sup>60, 61</sup>

Každá z těchto součástí přispívá k vysoké citlivosti, přesnosti a rozlišovací schopnosti hmotnostního spektrometru, což z něj činí nepostradatelný nástroj v moderní analytické chemii.<sup>59</sup>

## 2.4.2 Izotopové značení

Stabilní izotopové značení je klíčová metoda pro studium biosyntézy, metabolismu a transportu sfingolipidů. V této metodě se využívají stabilní izotopy, jako je deuterium [<sup>2</sup>H], uhlík-13 [<sup>13</sup>C] nebo dusík-15 [<sup>15</sup>N], které lze integrovat do různých prekurzorů sfingolipidů, například serinu, cholinu, glukózy nebo mastných kyselin, jako je kyselina palmitová. Tyto izotopy se také mohou přímo začlenit do sfingoidních bází a konečných molekul SL.<sup>62</sup> Izotopově značené sfingolipidy se často využívají jako vnitřní standardy pro kvantifikaci v buněčném metabolismu. Při použití [U-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]serinu a analýzy LC-MS/MS je možné detailně studovat *de novo* biosyntézu a metabolismus SL, například tvorbu dihydrosfingosin-1-fosfátu a inhibici ceramidsyntázy v lidských endoteliálních buňkách.<sup>63</sup> Kromě serinu se v izotopovém značení často používá značený palmitát. Ten může být začleněn jak do sfingoidní báze jako N-vázaná mastná kyselina (FA). Analýza izotopového obohacení v palmitoyl-CoA poolu umožňuje výpočet rychlosti *de novo* syntézy SL, což je klíčové pro pochopení dynamiky lipidového metabolismu.<sup>64</sup> Další značenou molekulou může být cholin nebo glukóza. Například použití [<sup>13</sup>C]glukózy umožňuje studium endogenního metabolismu glykosfingolipidů na molekulární úrovni.<sup>64</sup>

Při izotopovém značení je důležité věnovat pozornost posunu hmoty, který značení přináší. Například sfingosin a dihydrosfingosin vykazují hmotnostní rozdíl pouze

$^2\text{Da}$ , což může komplikovat rozlišení značených a neznačených molekul. Plně značená kyselina palmitová generuje výrazný posun hmoty, zatímco serin musí být značen více izotopy, aby poskytl dostatečný posun pro přesnou analýzu. Efektivní značení vyžaduje dostatečné obohacení izotopu v prekurzorovém poolu. U serinu, který je hojně přítomný v endogenních zdrojích, může docházet k ředění a snížení efektivity značení. Podobně mohou být nutné vysoké koncentrace značené kyseliny palmitové, což může narušit normální lipidový metabolismus nebo ovlivnit biosyntézu SL.<sup>64</sup>

Stabilní izotopové značení je také užitečné pro sledování transportních procesů, jako je intracelulární transport, buněčný export nebo transport lipoproteiny. Výzkum dynamiky a druhové specifity SL v různých kompartmentech buněk přispívá k lepšímu porozumění jejich biologických funkcí a roli v patologických stavech, jako jsou rakovina, kardiovaskulární choroby a neurodegenerativní onemocnění.

### 2.4.3 Příklady analytických metod nejčastěji využívaných pro sledování metabolismu sfingolipidů

**Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)** je klíčovou metodou pro analýzu izotopově značených sfingolipidů. Tato technika umožňuje detailní rozlišení izotopových variant a sledování jejich metabolismu a transportu v buňkách za použití trojitého kvadrupólového lineárního hmotnostního spektrometru nebo iontové pasti. Maximální citlivost je nezbytná pro analýzu krátkodobého značení a minoritních druhů sfingolipidů, což umožňuje sledovat metabolické procesy na subcelulární úrovni.<sup>65</sup>

**Hmotnostní spektrometrie s ultra vysokým rozlišením** umožňuje rozlišit hmotnostní izotopomery, které mohou být odvozeny od izotopů deuteria ( $^2\text{H}$ ) a uhlíku ( $^{13}\text{C}$ ). Sice sdílejí stejnou nominální hmotnost, ale liší se v atomovém složení, což lze rozlišit právě prostřednictvím hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (například pomocí kvadrupólového hmotnostního analyzátoru). Stanovení syntézy mastných kyselin (FA) se typicky analyzuje analýzou distribuce hmotnostních izotopomerů (MIDA). Hodnotí se pravděpodobnost začlenění izotopu do molekuly palmitátu (FA 16:0). Tento postup považuje syntézu FA za polymeraci C2-jednotek (např. acetyl-CoA) a umožňuje sledovat míru obohacení značeného substrátu v nově syntetizovaných lipidech.<sup>64, 66</sup>

## 2.4.4 Použití těžkých izotopů v molekule L-serinu

Jak již bylo zmíněno, izotopové značení L-serinu je často využíváno v biochemickém výzkumu ke sledování specifických metabolických drah, analýze enzymatických aktivit a studiu farmakologických intervencí, což přispívá k pokroku ve výzkumu lipidů a jejich role v buněčné biologii. Zde si můžeme uvést následující konkrétní příklady:

### 1. Studium biosyntézy sfinganin-1-fosfátu

Přímým přístupem pro monitorování biosyntézy SL je podávání značeného serinu. Berdyshev a kol. použili endoteliální buňky lidské plicní arterie (HPAEC) ke studiu účinku nadměrné exprese sfingosinkinázy-1 (SK1) na biosyntézu SL. Aplikací [U-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]serinu a analýzy LC-MS/MS tito autoři zjistili, že zvýšená aktivita SK1 vede k dramatickému zvýšení sfinganin-1-fosfátu, který je generován fosforylací *de novo* syntetizovaného sfinganinu.<sup>63</sup>

### 2. Interference s biosyntézou sfingolipidů - imunomodulační lék FTY720 inhibuje CerS

Dalším příkladem je studie, kde bylo použito stabilní izotopové pulzní značení endoteliálních buněk lidské plicní arterie pomocí [U-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]serinu s využitím kapalinové chromatografie-tandemové hmotnostní spektrometrie. Bylo zkoumáno působení FTY720, což je syntetický analog sfingosinu, který inhibuje CerS a upreguluje tvorbu dihydrosfingosin-1-fosfátu v lidských plicních endoteliálních buňkách. S využitím tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) se podařilo charakterizovat, jak FTY720 ovlivňuje *de novo* biosyntézu sfingolipidů, konkrétně transformaci dihydrosfingosinu na ceramid. Tento výzkum prokázal, jak izotopové značení serinu může být efektivně využito k mapování metabolických drah a studiu farmakologických intervencí.<sup>65</sup>

### 3. Použití v lipidomických studiích

Izotopově značený L-serin byl rovněž použit v širších lipidomických studiích, Například v experimentálním přístupu FLUX lipidomiky byla přidána [U-<sup>13</sup>C]glukóza spolu s izotopově značeným L-serinem do buněk a bylo pozorováno rychlé začlenění stabilní izotopově značené glukózy a galaktózy. To umožnilo sledovat nejen celkový obrat sfingolipidů, ale také identifikaci a kvantifikaci endogenních lipidových druhů na molekulární úrovni.<sup>67</sup>



### 3 Výsledky a diskuse

Pro přípravu sfingosinu je známo více syntetických cest a je možné ho připravit různými způsoby, jak je zmíněno v teoretické části. Pro syntézu značeného sfingosinu v našich podmínkách byla zvolena strategie, která vychází z vinylovaného Garnerova aldehydu (což je molekula chráněného L-serinu), ke kterému se pomocí Grubbsovy metateze připojoval řetězec, který bude obsahovat izotopově značenou část. V navrženém sledu reakcí pro tuto práci začíná syntéza již od hexanolu z důvodu značení celé molekuly a dostupnosti značeného [ $^{13}\text{C}_6$ ]hexanolu. Tato značená část molekuly bude dále zvýrazněná ve schématu modrou barvou.

Pro syntézu značeného sfingosinu bylo zvoleno izotopové značení pomocí  $^{13}\text{C}$  uhlíků. Molekulu by též bylo možné označit deuteriem a vzhledem k náročnosti prvního kroku ideálně začít syntézu až od (deuteriem značeného) hexanolu- $\text{D}_{12}$ . Avšak výhoda značení pomocí  $^{13}\text{C}$  uhlíku je ta, že nedochází k tak velké změně tvaru a chování molekuly (zejména v chromatografickém systému na reverzní fázi) oproti značení deuteriem. Šest izotopově odlišných atomů je potom dostatečný počet, aby při hmotnostní spektrometrii nedocházelo k záměně s jinými molekulami nebo k interferenci s přirozeně se vyskytujícími izotopy. Deuteriem značené lipidy potom mají své jiné specifické využití (infračervená spektroskopie nebo nukleární magnetická rezonance v pevné fázi), nicméně pro naše potřeby je výhodnější využití značením izotopu uhlíku, protože primárním cílem byla příprava vnitřních standardů pro hmotnostní spektrometrii.

Příprava sfingosinu byla nejprve vyzkoušena na malém množství látky a následně ověřena na větším množství látky, případně dále opakována za změny reakčních podmínek. Vzhledem k cenové náročnosti izotopově značených molekul byla celá optimalizace prováděna s využitím neznačených molekul. Jelikož byly reakce prováděny vícekrát, mnohdy počáteční množství látky nesouhlasí s konečným množstvím produktu předchozí reakce.

Navržená syntéza obsahuje sled 10 reakcí.

### 3.1 Schéma syntézy

Prvním krokem syntézy sfingosinu (10) v této práci byla oxidace primárního alkoholu (hexanolu) na aldehyd (1) a souběžně byla připravena fosfoniová sůl (2) z 9-bromnonanové kyseliny přímou kondenzací této kyseliny s trifenylnfosfinem v tavenině. Následně byl aldehyd pomocí Wittigovy reakce s fosfoniovou solí (2) převeden na nenasycenou kyselinu (3). Po hydrogenaci dvojně vazby (4) vodíkem na palladiu následovala redukce karboxylové skupiny pomocí boranu v tetrahydrofuranu na primární alkohol (5).

Jako výchozí látku pro Grubbsovu metatezi bylo následně potřeba připravit terminální alken. Tato eliminace standardně probíhá špatně na primárním alkoholu nebo alkylhalogenidu, proto byl zvolen postup využívající selenokyanát. Tato reakce proběhla úspěšně za vzniku alkenu (7). Pomocí Grubbsovy metateze s připraveným vinylovaným (S)-Garnerovým aldehydem (8) byl převeden alken (7) na chráněný analog sfingosinu (9) se správnou stereochemií odpovídající v přírodě běžnému sfingosinu. V posledním kroku byly odstraněny chránící skupiny v kyselém prostředí za vzniku finální molekuly sfingosinu (10).

Schéma 5 popisuje deseti krokovou syntézu sfingosinu, která byla navržena pro tuto práci. Jednotlivé kroky syntézy budou dále detailněji diskutovány.

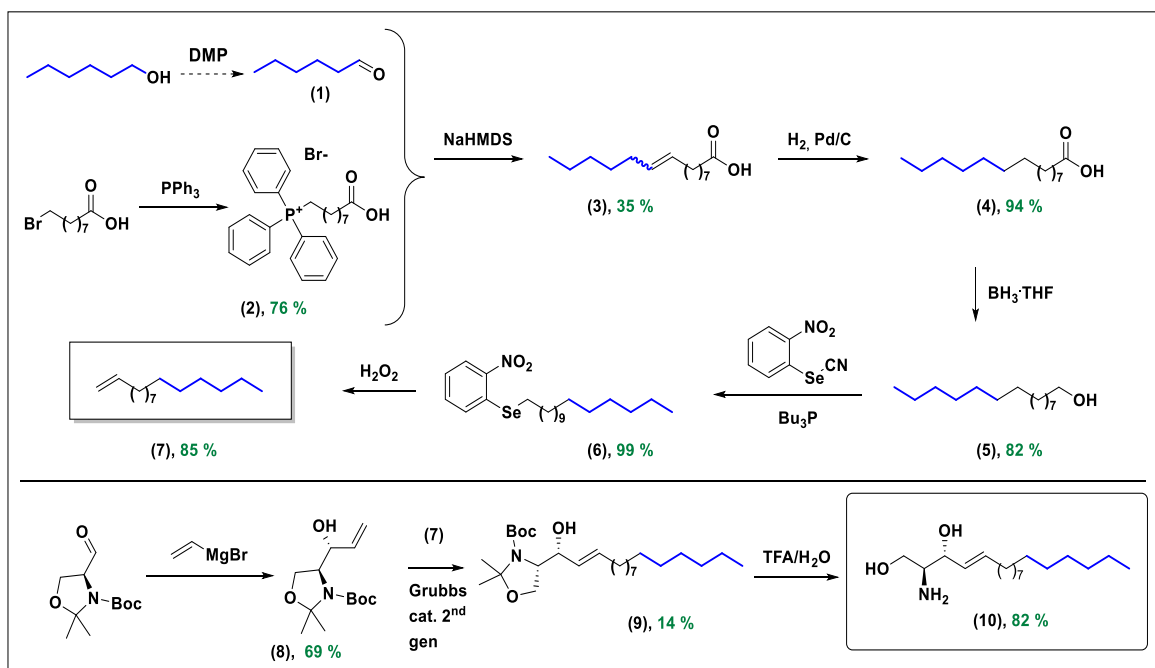


Schéma 5: Schématické znázornění navržené syntézy sfingosinu pro tuto práci; DMP – Dess-Martinův periodinan, TFA – trifluoroctová kyselina, NaHMDS – hexamethyldisilazan sodný,  $BH_3 \cdot THF$  – boran-tetrahydrofuranový komplex

## 3.2 Příprava Hexanalu

Tato syntéza začíná oxidací primárního alkoholu hexanolu na hexanal. Celkově byly zkoušeny tři oxidace, z toho dvě neúspěšné. Na první pohled se tato reakce jeví jako snadná, avšak vzhledem k nízké teplotě varu hexanolu je komplikované tuto látku dostatečně vysušit v malém množství, případně přečistit. Je potřeba si uvědomit, že finální syntéza s využitím izotopově značeného řetězce bude probíhat v malém množství vzhledem k ceně této výchozí látky. Proto metody, jako je například destilace, nelze dostatečně dobře využít.

### Swernova oxidace

Jako první byla zvolena Swernova oxidace<sup>68</sup>, která běžně poskytuje vysoké výtěžky produktů i v malých množstvích a při které vzniká minimum vedlejších produktů. S touto reakcí máme v pracovní skupině bohaté zkušenosti, proto byla první volbou. Navíc Swernova oxidace přináší výhodu v podobě eliminace potřeby toxických kovů, jako je chrom, a může být prováděna za velmi mírných podmínek. Tato reakce umožňuje efektivní přípravu aldehydů a ketonů z primárních a sekundárních alkoholů, přičemž aldehydy dále nereagují za vzniku karboxylových kyselin. Je však třeba počítat s nevýhodou v podobě vzniku vedlejšího produktu, dimethylsulfidu, který má nepříjemný zápach.<sup>69</sup>

#### Mechanismus Swernovy oxidace:

Dimethylchlorosulfoniový iont je generován *in situ* z DMSO a oxalychloridu, který následně v přítomnosti alkoholu podléhá intramolekulární deprotonaci prostřednictvím pětičlenného cyklického přechodového stavu a následné fragmentace za vzniku cílového produktu a dimethylsulfidu (DMS)<sup>69</sup> (Schéma 6):

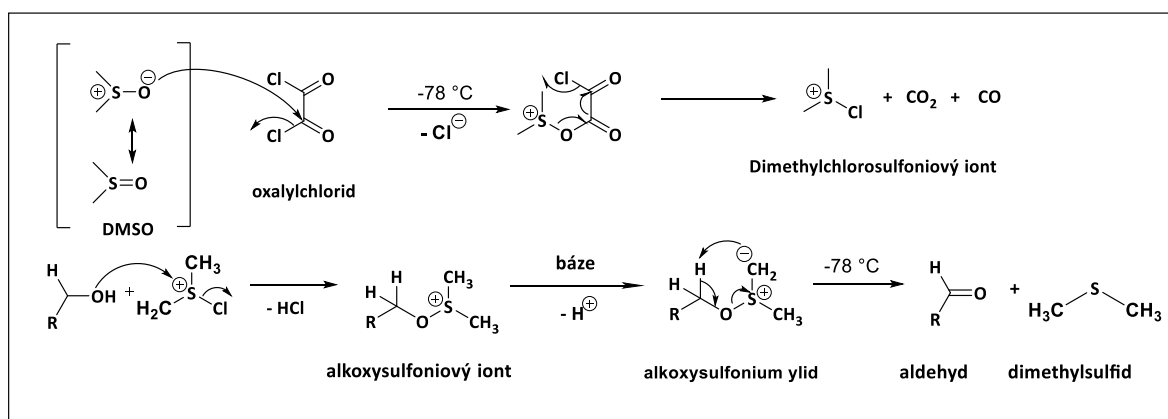


Schéma 6: Mechanismus Swernovy oxidace

Pokud teplota není udržována na dostatečně nízkých hodnotách (obecně pod  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), může dojít ke vzniku thioacetalů (Schéma 7):

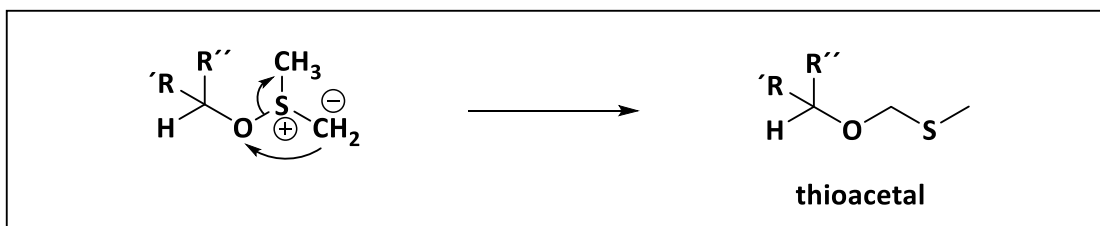


Schéma 7: Schéma tvorby nežádoucího produktu thioacetalu

Ani po několika opakování a úpravě reakčních podmínek jsme nedocílili vzniku hexanalů nebo jsme ho nedokázali v reakční směsi identifikovat.

### Oxidace pomocí pyridinium chlorchromátu

Další z možností byla oxidace za použití pyridinium chlorchromátu (PCC)<sup>70</sup>, známého také jako Corey-Suggsovo činidlo. PCC oxiduje alkoholy o jednu úroveň na oxidačním žebříčku – primární alkoholy na aldehydy a sekundární alkoholy na ketony. Tyto oxidační reakce jsou ve své podstatě eliminací, kde reakce začíná s jednoduchou vazbou uhlík-kyslík, která se přemění na dvojnou vazbu uhlík-kyslík. K eliminaci dochází díky dobré odstupující skupině na kyslíku, konkrétně chromu.<sup>71</sup>

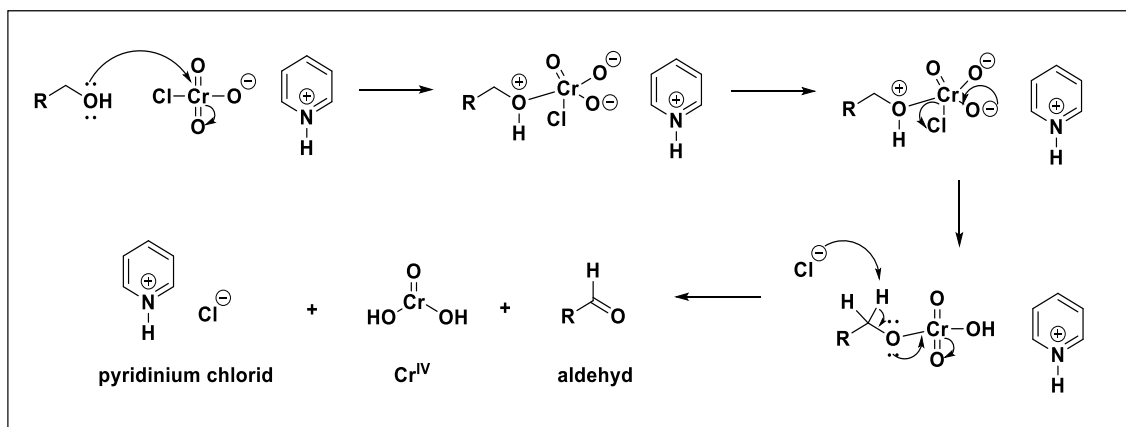


Schéma 8: oxidace pomocí PCC na aldehyd

Jak je možné vidět na schématu 8, prvním krokem je útok kyslíku na chrom, čímž vzniká vazba Cr-O. Následně chloridový aniont odstupuje v reakci připomínající 1,2-eliminaci, což vede k tvorbě tzv. esteru chromanu. Dvojná vazba C-O se vytvoří, když báze odštěpí proton z uhlíku sousedícího s kyslíkem za současného rozpojení vazby O-Cr a  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  se redukuje na  $\text{Cr}^{\text{IV}}$  (zde zobrazeno jako  $\text{O}=\text{Cr}(\text{OH})_2$ ).<sup>71</sup>

PCC se získá přidáním pyridinu ke kyselině chlorochromové (schéma 9), která vzniká rozpuštěním oxidu chromového v 6M vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové. Výsledkem jsou oranžové krystaly.<sup>71</sup>

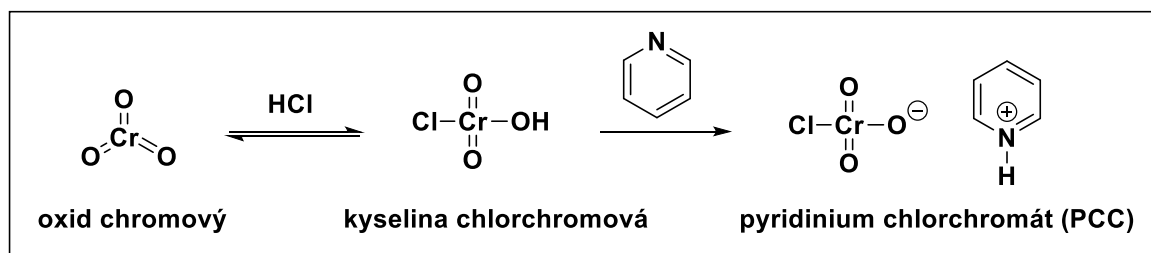


Schéma 9: Reakce tvorby PCC z oxidu chromového

Vlastnosti PCC lze srovnat s vlastnostmi pyridinium dichromátu (PDC). PDC není hygroskopický, je stabilní, komerčně dostupný a dobře skladovatelný. PCC je dobře rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech, zejména v dichlormethanu při pokojové teplotě, zatímco dimethylformamid (DMF) podporuje nadměrnou oxidaci primárních alkoholů na karboxylové kyseliny.<sup>72</sup>

PCC je kyselější než PDC, ale kyselé labilní sloučeniny lze oxidovat za přítomnosti pufrů, jako je octan sodný nebo uhličitaný. Nevýhodou PCC je tvorba viskózních materiálů, které komplikují izolaci produktu. Přidáním práškových molekulových sít nebo síranu hořečnatého do reakční směsi lze zjednodušit zpracování, protože redukováná sůl chromu a další vedlejší produkty se vysráží jako pevné látky, které lze následně snadno odstranit filtrací.<sup>72</sup>

Bylo testováno několik postupů. První z nich měl eliminovat vlhkost hexanolu pomocí molekulových sít a zajistit bezvodé podmínky, kdy by se voda navázala na molekulová síta. Nicméně ani tato metoda nebyla úspěšná. Proto byl vyzkoušen jiný postup<sup>73</sup>, který měl umožnit lehce vodné podmínky, aniž by výrazně ovlivnil průběh reakce. Ani tento postup však nevedl k požadovanému produktu.

### Dess-Martinova oxidace

Poslední zkoušenou reakcí byla Dess-Martinova oxidace.

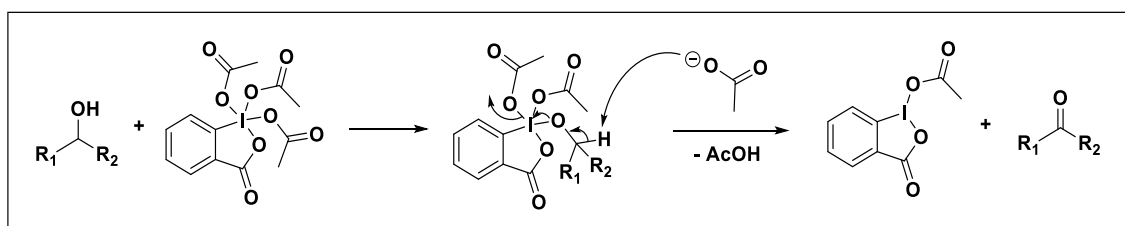


Schéma 10: Mírná oxidace primárních a sekundárních alkoholů na aldehydy a ketony pomocí Dess-Martinova periodinanu (zjednodušené schéma). V případě tvorby aldehydů odpovídá R1 = H, R2 = alkyl

Jak je možné vidět na schématu 10, reakce začíná napadením atomu jódu z Dess-Martinova periodinanu (DMP), při níž alkohol nahrazuje jeden z acetátových fragmentů, což je následováno deprotonací vedoucí k tvorbě aryliodo(III) esteru. Tento periodinanový meziproduct se pak přemění na příslušnou karbonylovou sloučeninu, pravděpodobně intramolekulárním odštěpením  $\alpha$ -vodíku, které vede ke vzniku vazby C=O. Reakce využívá hypervalentní jódové činidlo, podobné kyselině 2-jodoxybenzoové, k selektivní a mírné oxidaci alkoholů na aldehydy nebo ketony. Obvykle se provádí v chlorovaných rozpouštědlech, jako je dichlormethan nebo chloroform, a může být dokončena při pokojové teplotě velmi rychle.<sup>74</sup>

První provedená reakce neprokázala žádnou přítomnost aldehydů, což jsme zjistili díky neschopnosti detekovat je běžnou vypalovací směsí na TLC. Druhá reakce<sup>75</sup> již proběhla pozitivně za vzniku alkoholu i aldehydu zároveň. Ve třetí reakci jsme nechali reakční čas na 12 hodin, za předpokladu zreagování celého alkoholu, přičemž oxidace proběhla až do vzniku karboxylové kyseliny. Také vzhledem k relativní nestálosti hexanalů a jeho rychlému rozkladu, bylo nutné provádět detekci a zpracování ihned. Kvůli již zmiňované nízké  $T_v$  byla jeho detekce velmi obtížná. Detekce pomocí běžné detekční směsi a následné vypálení pistolí nebylo možné. Jako ověřovací metodu jsme tedy použili NMR a detekční směs 2,4-dinitrofenylhydrazinu, nicméně detekce nebyla dostatečná. Nakonec jsme zvolili detekční směs  $KMnO_4$ , která po vypálení zbarví aldehyd žlutě.

### 3.3 Fosfoniová sůl

Pro Wittigovu reakci jsou nutné 2 komponenty – aldehyd a fosfoniová sůl. Fosfoniová sůl byla připravena přímou reakcí 9-bromnonanové kyseliny a trifenyfosfinu při zahřívání v tavenině bez rozpouštědla. Fosfoniová sůl se vyskytuje ve více modifikacích, a to jak v amorfní hmotě, tak v krystalické formě. Pro naše účely bylo potřeba převést tuto amorfni lepivou hmotu do krystalické formy. Toho jsme dosáhli rozpuštěním hmoty ve větším množství chloroformu a následně jsme tento roztok po kapkách pomocí stříkačky přidávali do vymraženého  $Et_2O$ . Následně se směs vložila do mrazáku a nechala se zde do druhého dne za tvorby krystalů, které byly následně odfiltrovány. Pro precipitaci byla také zkoušena různá rozpouštědla, včetně například acetonitrilu, avšak podporu tvorby krystalů nevyvolaly.

### 3.4 Wittigova reakce

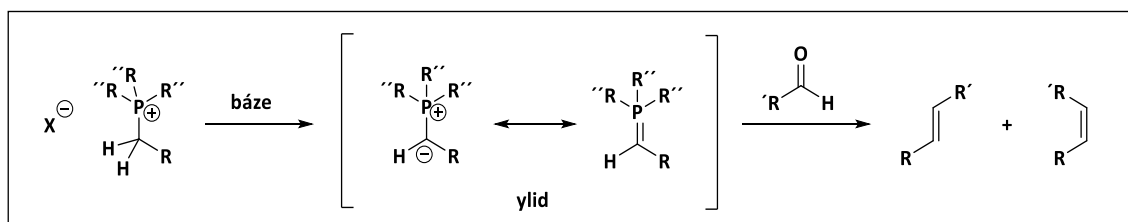


Schéma 11: Obecná reakce tvorby fosfonium ylidu

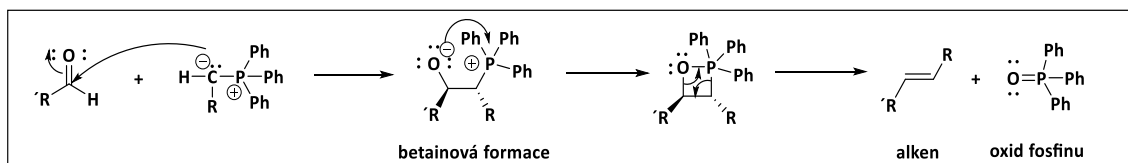


Schéma 12: Mechanismus tvorby betainu a následný vznik trifenylofosfanoxidu.

Wittigova reakce slouží k přípravě alkenů reakcí aldehydu nebo ketonu s ylidem vzniklým z fosfoniové soli, který vzniká jako meziprodukt (Schéma 11, Schéma 12). Geometrie výsledného alkenu závisí na reaktivitě vytvořeného ylidu. Pokud je R skupina elektronově přitahující, ylid je stabilizovaný a méně reaktivní. Naopak, pokud je R skupina alkylová, ylid je destabilizovaný, což vede k vyšší reaktivitě a rychlejšímu průběhu reakce. Stabilizované ylidy většinou vedou ke vzniku (*E*)-alkenů, zatímco destabilizované ylidy dávají převážně (*Z*)-alkeny (schéma 13). V našem případě geometrie dvojné vazby není podstatná, protože bude v následujících krocích redukována.<sup>76, 77</sup>

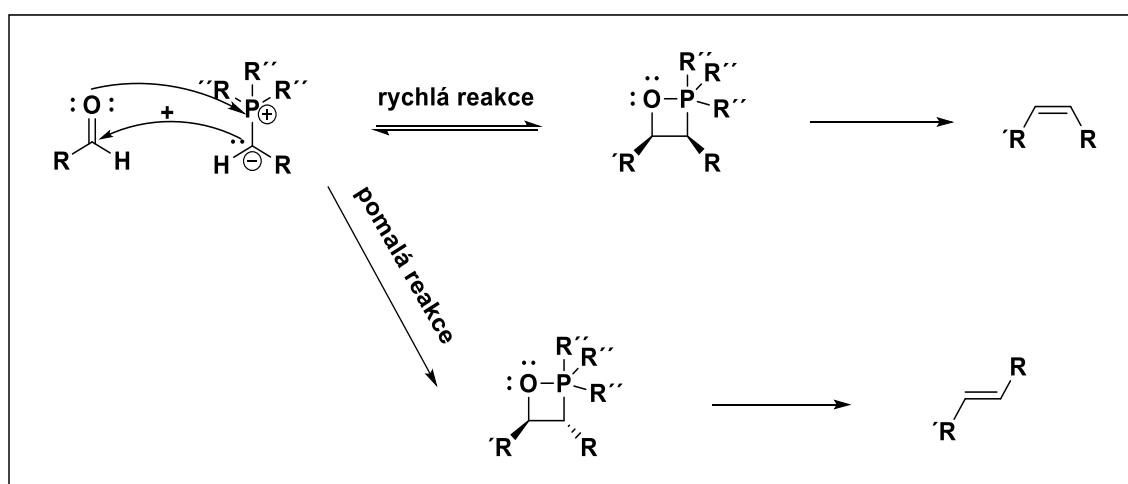


Schéma 13: mechanismus (2+2) cykloadice ylidu s meziproduktem oxafosfetanem a následná tvorba (*Z*)-alkenů a (*E*)-alkenů

Vykrytalizovaná fosfoniová sůl byla vysušena a pod atmosférou argonu rozsuspendována v suchém THF. Po ochlazení na  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla přidána báze

hexamethyldisilazan sodný (NaHMDS) za žluto-oranžového zbarvení, které značí tvorbu fosfonium ylidu a následně po 45 min chlazení byl přikapáván aldehyd (1). V této syntéze byl použit komerčně dostupný hexanal. Po chvíli se roztok odbarvil na čirý. Po změně teploty na pokojovou a ponechání reakce do druhého dne se reakční směs změnila na hustou zakalenou tekutinu.

### 3.5 Hydrogenace dvojných vazeb

Dalším krokem syntézy byla hydrogenace dvojných vazeb nacházející se na devátém uhlíku pentadecenové kyseliny. Toho jsme docílili přidáním katalytického množství 10 % Pd/C k látce (3). Pod atmosférou vodíku byla reakční směs nechána reagovat do druhého dne. První reakce poskytla výtěžek 94 % a druhá 99 %. K drobným ztrátám došlo při filtraci palladiového katalyzátoru na aktivním uhlí. Podle literatury může být výtěžek až kvantitativní.

### 3.6 Redukce karboxylové kyseliny

Pátým krokem syntézy byla redukce karboxylové kyseliny s využitím komplexu boranu a tetrahydrofuranu, za vzniku alkoholu (5). Kvůli nezreagovanému boranu byla směs 3x promyta v MeOH. Tento typ redukce obvykle poskytuje vysoké výtěžky produktu, a i v našem případě se podařilo docílit výtěžku převyšujícího 80 %.

### 3.7 Převedení na selenid

V následujícím kroku bylo potřeba vytvořit terminální alken. Eliminační reakce u primárních alkoholů nebo alkyhalogenidů jsou poměrně složité. V našem případě jsme zvolili dříve publikovaný postup využívající reakce se selenokyanátem, kdy produkt této reakce umožní v příštím kroku požadovanou eliminaci. První reakce v malém množství, u které jsme optimalizovali podmínky, proběhla za výtěžku 89 % a druhá s větším množstvím látky a s většími zkušenostmi s touto reakcí již s výtěžkem 99 %.

### 3.8 Příprava alkenů

Tato reakce byla rovněž optimalizována. Při reakci jsme použili nejdříve 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ale reakce neproběhla úplně. Pro novou reakci jsme koncentraci peroxidu raději zvýšili na 50 % a eliminační reakce v tomto případě proběhla s výtěžkem kolem 85 %.

### 3.9 Příprava vinylovaného GA

Dalším krokem v syntéze sfingosinu byla nukleofilní adice vinylmagnesiumbromidu na (S)-Garnerův aldehyd. Garnerův aldehyd představuje klíčovou výchozí látku

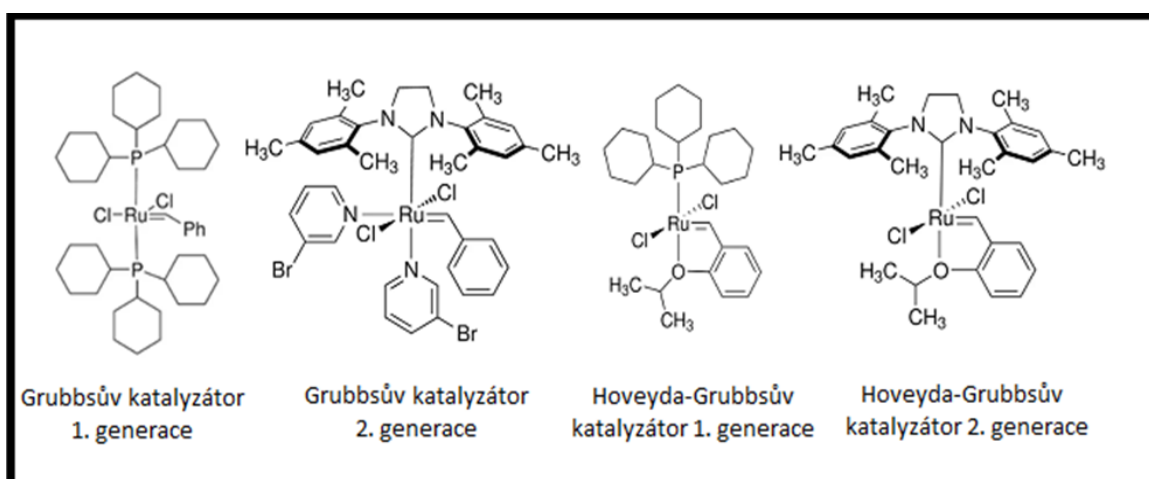


při syntéze sfingolipidů. Jedná se o dvakrát chráněný L-serin (vnáší tedy do molekuly produktu definované chirální centrum), kterému nezůstal žádný kyselý atom vodíku a je tedy možné nechat jej přímo reagovat i se silnými zásadami typu Grignardových sloučenin. Při této reakci vzniká dvojice (*syn*- a *anti*-) diastereoizomerů, jelikož v molekule vzniká nové centrum chiralit. Reakce probíhala za přítomnosti hexamethylfosforamidu (HMPA), který zvyšuje výtěžek požadovaného *anti*- izomeru na úkor izomeru druhého.<sup>78</sup> Vzniklé diastereomery se následně podařilo chromatograficky od sebe oddělit, jelikož se mírně liší jejich retence na normální fázi (silikagel).

(*S*)-Garnerův aldehyd (7) byl rozpuštěn v suchém THF v inertní atmosféře. Reakce probíhala za snížené teploty (-78 °C) v bezvodém THF. Do roztoku bylo injekční stříkačkou přikapáváno HMPA a velmi opatrně po kapkách přidáván komerčně dostupný 0,7 M roztok vinylmagnesiumbromidu. Po 4 hodinách míchání při této teplotě bylo provedeno TLC, které potvrdilo zreagování veškeré výchozí látky. Reakce dosáhla výtěžku kolem 70 %. U reakce se prokázala důležitost snížené teploty, jelikož v jedné z reakcí nebyla teplota plně dodržena po dobu 2 hodin a výtěžek reakce klesl na 42 %.

### 3.10 Grubbsova metateze alkenů

Dalším krokem reakce byla Grubbsova metateze alkenů neboli metateze olefinů. Jedná se o reakce dvou molekul olefinů (alkenů) za přítomnosti katalyzátoru. Při reakci dochází k rozdělení jedné dvojně vazby alkenů mezi atomy uhlíku a spojení s druhou dvojnou vazbou alkenů druhého. Reakci podporují různé druhy katalyzátorů vycházejících ze sloučenin obsahujících ruthenium. Nejpoužívanějšími jsou Grubbsův katalyzátor 1. a 2. generace a dále Hoveyda-Grubbsův katalyzátor 1. a 2. generace.<sup>79</sup> (Obrázek 11) Přičemž v této reakci byl použit Grubbsův katalyzátor a 2. generace.



Obrázek 11: Grubbsovy katalyzátory obsahující ruthenium

### Michanismus Grubbsovy metateze alkenů:

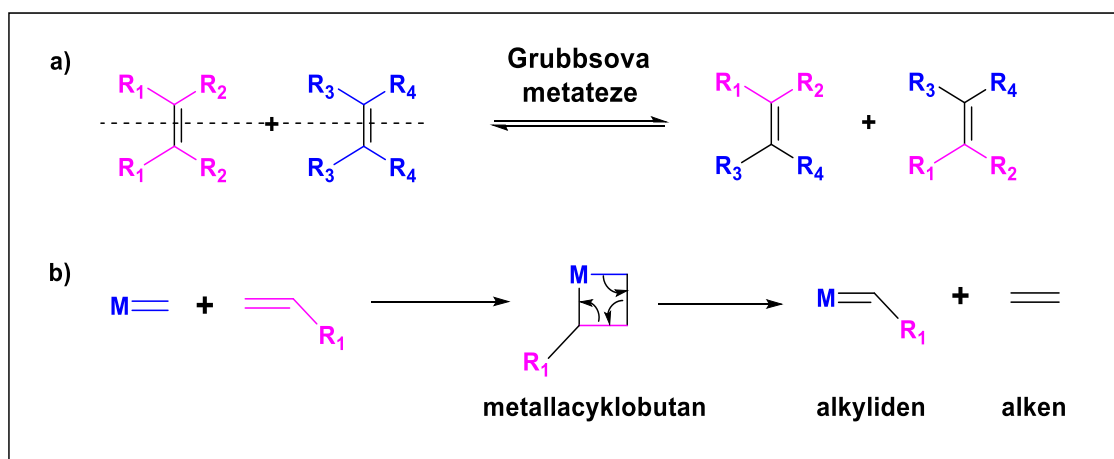


Schéma 14: Mechanismus Grubbsovy metateze - a) Obrazné znázornění reakce metateze olefinů, kde dochází k výměně fragmentů mezi dvěma alkeny<sup>80</sup>; b) Mechanismus (2+2) cykloadice za vzniku meziproductu metallacyklobutanu a následného štěpení na alkyliden kovu a alken.

Alkyliden kovu reaguje s alkenem prostřednictvím [2 + 2] cykloadiční reakce za vzniku metallacyklobutanového meziproductu. Ten následně prochází cykloeliminační reakcí za vzniku nového alkenu (Schéma 14).

Reakce může probíhat až do té doby, než se spotřebují výchozí látky, které poskytují danou reakci olefinů nebo veškerý katalyzátor, který byl do reakce přidán. Selektivita může být ovlivněna změnou poměrů výchozích látek či použitím stericky objemných substituentů.

Reakce probíhala za vzniku 2 diastereomerů. Jejich oddělení bylo velmi obtížné. Z toho důvodu bylo čištění sloupcovou chromatografií provedeno opakovaně za použití různých mobilních fází (Hex:EtOAc - 50:1/30:1). Výsledně zvolená mobilní fáze (Hex:EtOAc - 40:1) byla průměr předešlých a jevila se jako lepší pro separaci izomerů. Každý izomer má rozdílnou hodnotu retenčního faktoru, ale tyto rozdíly jsou velmi malé, proto je tato separace komplikovaná.

Reakce byla dvakrát opakována. Čistý produkt byl oddělen jen částečně, a to s výtěžkem 14 % v obou reakcích. Zbytek produktu byla směs těchto diastereomerů, která dále v syntéze nebyla použita. Dle literatury<sup>81</sup> by bylo možné dosáhnout výtěžku až 37±5 %. Větších výtěžků by šlo pravděpodobně dosáhnout, pokud by byl sloupec ještě vícekrát znovu zopakován. Pro naše potřeby to však již nebylo nutné, získali jsme potřebné množství produktu pro následující reakce.

### 3.11 Odchránění polární hlavy

Závěrečným krokem syntézy sfingosinu bylo odchránění polární hlavy pomocí silné organické kyseliny – trifluoroctové kyseliny (TFA). Reakce probíhala ve vodném prostředí narozdíl od většiny reakcí v této syntéze. Vzhledem k nerozpustnosti výchozí látky v tomto roztoku probíhala reakce v suspenzi. Směs byla chlazená v ledové lázni z důvodu exotermické reakce po přidání vodného roztoku TFA. Reakci jsme zastavili přidáním nasyceného vodného roztoku  $\text{NH}_3$ , čímž byl roztok alkalizován na  $\text{pH} = 9$ . Bazické prostředí udržuje naši látku v organické fázi. Důležitým krokem této reakce byla charakterizace a čištění vzniklého produktu. Jelikož se jedná o primární amin lipofilní povahy a silikagel má kyselé OH skupiny, byl přidán do mobilní fáze (sloupcové a tenkovrstvé chromatografie) triethylamin (TEA) a tento problém tím vyřešen.

Výsledným produktem je sfingosin, který byl ověřen pomocí TLC se standardem sfingosinu a vše bylo potvrzeno pomocí NMR. Po dosušení na hlubokém vakuu výsledná hmotnost sfingosinu vyšla 17 mg, což odpovídá výtěžku **82 %**. Sfingosin se může vyskytovat ve více podobách, buď jako amorfni olejovitá hmota nebo jako bílá krystalická látka. Pro převedení amorfni olejovité hmoty na krystalickou formu byl použit methanol. Princip je v tom, že lipidy obecně špatně krystalizují z chloroformu, ve kterém jsou velmi dobře rozpustné. Rozsuspendování a následné (i několikanásobné) odpaření z methanolu poté většinou vede k tvorbě krystalické struktury. Po neúspěšném pokusu byla látka ponechána v exikátoru pod vakuem do druhého dne pro případné odpaření reziduí rozpouštědel. V našem případě se však nepodařilo sfingosin převést do krystalické podoby, pravděpodobně z důvodu příliš malého množství finálního produktu, což pravděpodobně bránilo v krystalizaci. Avšak spektrální metody potvrdily strukturu i čistotu připravené látky.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Technické parametry a chemikálie

Výchozí látky, činidla a rozpouštědla a další komerčně dostupné chemikálie, které byly při syntéze použity byly dodané od firem: Merck (Darmstadt, Německo), VWR/Avantor (Stříbrná Skalice, Česká republika), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika). Počáteční výchozí látky byly též komerčně dostupné.

Na čištění látek pomocí sloupcové chromatografie byl použit Silikagel 60 (230-400). Pro kvantitativní důkaz látek, ověření průběhu chemických reakcí, kontrolu čistoty produktů byla využita tenkovrstevná chromatografie na hliníkových TLC deskách s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 (Merck). Pro detekci vyvinutých desek bylo použito více detekčních směsí. Většina látek byla detekována běžnou detekční směsí  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ , koncentrovaná  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a voda. Pro detekci aldehydů byla použita detekční směs  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 10% roztok  $\text{NaOH}$  a voda. Na ověření konjugovaných vazeb byla použita UV lampa (UV Lamp 4, Camag, Muttenz, Švýcarsko) při vlnových délkách 254 a 366 nm a pro lepší rozpouštění a zvýšení kinetické energie ultrazvuková lázeň.

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra všech látek byly naměřené pomocí přístrojů VARIAN VNMR S500 a JEOL JNM-ECZ 600R v roztocích  $\text{CDCl}_3$  (nebo směsi  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ ) Chemický posun byl určen nepřímo dle zbytkového signálu z rozpouštědel. Spektra byla vyhodnocena pomocí počítačového programu MestReNova.

Infračervená spektra byla změřena spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) technikou ATR (attenuated total reflectance; Ge krystal) v rozmezí  $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ .

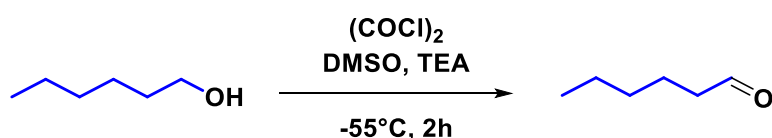
Schémata chemických reakcí byla vytvořena pomocí programu ChemDraw Professional.

## 4.2 Postup přípravy

V následujících schématech u jednotlivých postupů přípravy modře značený řetězec označuje izotopově značené molekuly, i když nebyly v rámci této práce použity. Jednotlivé reakce byly prováděny vícekrát, a tak mnohdy počáteční množství látky nesouhlasí s konečným množstvím produktu předchozí reakce.

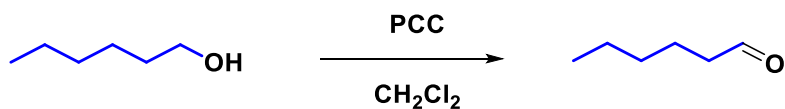
### Hexanal (1)

#### Swernova oxidace



V první baňce bylo rozpuštěno 118  $\mu\text{l}$  (1,370 mmol)  $(\text{COCl})_2$  v 6 ml suchého DCM za bezvodých podmínek. Do druhé baňky bylo přidáno 209  $\mu\text{l}$  (2,936 mmol) DMSO a zředěno 1 ml suchého DCM pod inertní atmosférou Ar a tento roztok byl přenesen k roztoku  $(\text{COCl})_2$ . Po 10 min chlazení na  $-55\text{ }^\circ\text{C}$  bylo po kapkách přidáno 110 mg (1,076 mmol) hexanolu v 1 ml suchého DCM. Reakční směs se za stálého chlazení míchala hodinu a poté byl přidán TEA (409  $\mu\text{l}$ , 2,936 mmol). Po dalších 30 minách bylo chlazení vypnuto a směs nechána míchat přes noc. Vzhledem k tomu, že tenkovrstvá chromatografie nepotvrdila vznik produktu, nebyla reakční směs dále zpracovávána.

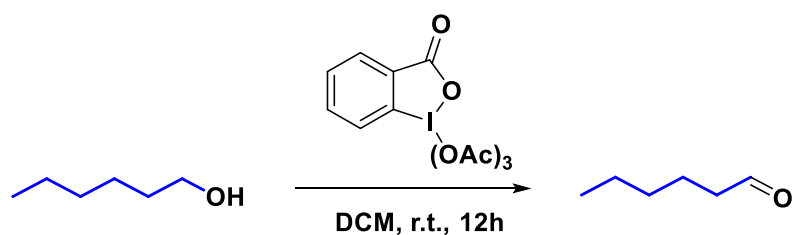
#### Oxidace pomocí PCC



Do 100 ml srdcové banky s vysušenými molekulovými síty bylo naváženo 2,64 g (12,233 mmol) PCC a za chlazení byl přidáno 500 mg hexanolu (4,893 mmol) v 8 ml suchého DCM. Vznikla tmavá černá suspenze. Reakční čas byl 3 hodiny. Po ukončení reakce bylo přilito 10 ml  $\text{Et}_2\text{O}$ , přidáno 3 g silikagelu a byla provedena dekantace. Vzniklá

tmavě hnědá látka pryskyřičného polymeru byla promyta ještě třemi dávkami 20 ml Et<sub>2</sub>O. Směs byla dále promyta pomocí vodných roztoků 2× 15 ml 5 % NaOH, 2× 5 ml 5 % HCl, 10 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub>. Etherová vrstva byla po extrakci bílá olejovitá kapalina. Nakonec byla organická vrstva dosušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a směs odpařena na dusíku. Vzhledem k tomu, že tenkovrstvá chromatografie nepotvrdila vznik produktu, nebyla reakční směs dále zpracovávána

### Dess-Martinova oxidace



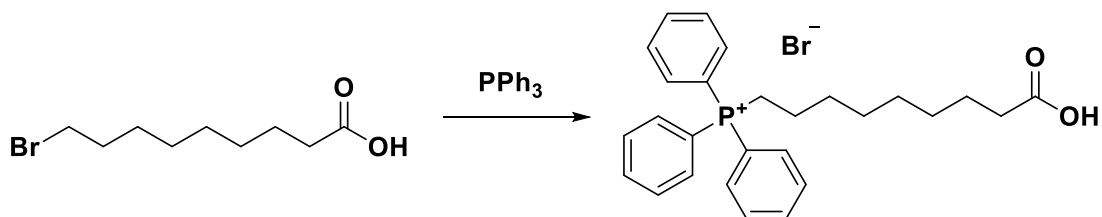
Do 25 ml srdcové baňky bylo naváženo 100 mg (0,978 mmol) hexanolu, přidáno 5 ml DCM. Tento roztok byl přenesen do roztoku 498 mg (1,174 mmol) DMP v 5 ml DCM. Po 12 hodinách míchání bylo provedené kontrolní TLC (Hex:EtOAc - 4:1), které potvrdilo zreagování hexanolu. Následně byl produkt přefiltrován přes silikagel a promyt chloroformem. Následně bylo k filtrátu přidáno 100 ml Et<sub>2</sub>O, a roztok byl promyt 100 ml 1M roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 150 ml 0,5M roztoku NaHCO<sub>3</sub> a 50 ml H<sub>2</sub>O. Organická fáze byla vysušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dále byla rozpouštědla odpařena částečně na vakuové pumpě a částečně na dusíku, aby nedošlo k případnému odpaření hexanal. Takto připravený hexanal by bylo možné použít pro další reakci bez dodatečného čištění. Vzhledem k tomu, že pro syntézu sfinhosinu bez izotopového značení jsme měli k dispozici komerčně dostupný hexanal, nebyla tato látka více charakterizována.

### Charakterizace látky 1

Čirá olejovitá kapalina

MW: 100,16 g/mol

## (8-karboxyoktyl) trifenyfosfonium bromid (2)



Do 250 ml destilační baňky bylo naváženo 3 g (12,650 mmol) 9-bromnonanové kyseliny a 3,456 g PPh<sub>3</sub> (13,157 mmol). Směs byla zahřáta na 140 °C a nechána reagovat za stálého míchání po dobu 24 h. Po skončení reakce bylo zahřívání vypnuto, směs zchlazena na laboratorní teplotu a následně rozpuštěna v 30 ml CHCl<sub>3</sub>.

Do 1 litru vymraženého Et<sub>2</sub>O byla po kapkách přidávána rozpuštěna fosfoniová sůl za vytvoření krystalizačních jader. Produkt ponechán v mrazáku do druhého dne. Po vytvoření krystalů byly tyto krystaly zfiltrvány a důkladně vysušeny. Výsledné množství bylo 4,76 g, což odpovídá výtěžku **76 %**.

### Charakterizace látky 2

Bílá krystalická látka

MW: 499,43 g/mol

TLC: (Hex/EtOAc 6:1 + CH<sub>3</sub>COOH), R<sub>f</sub> = 0,00; (CH<sub>2</sub>Cl/MeOH 10:1), R<sub>f</sub> = 0,3.

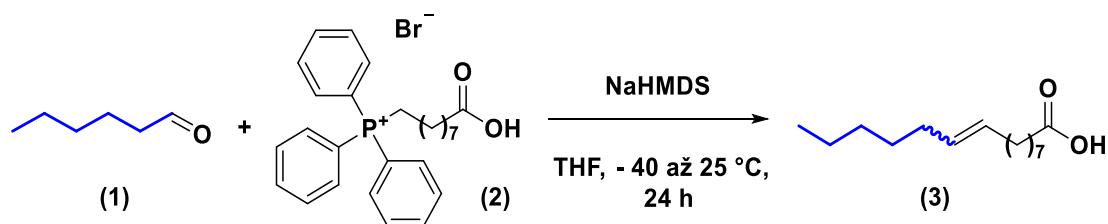
Teplota tání: 70-74 °C

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 7.85 – 7.75 (m, 9H), 7.75 – 7.67 (m, 6H), 3.66 – 3.57 (m, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.67 – 1.49 (m, 6H), 1.31 – 1.13 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR: (126 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 176.92, 135.06, 135.04, 133.60, 133.52, 130.56, 130.46, 118.54, 117.86, 34.40, 30.02, 29.90, 28.35, 28.33, 28.29, 24.50, 22.79, 22.40, 22.36.

IR (ATR): 3375, 2934, 2869, 1741, 1717, 1588, 1485, 1466, 1438, 1385, 1206, 1164, 1113, 996, 892, 844, 802, 762, 745, 722, 699, 689 cm<sup>-1</sup>

## Pentadec-9-enová kyselina (3)



5,97 g (12,560 mmol) fosfoniové soli **(2)** bylo resuspendováno v 180 ml suchého THF pod inertní atmosférou Ar. Vzniklá suspenze byla ochlazena na -40 °C. Za dodržení bezvodých podmínek bylo po kapkách přidáno 34,33 ml (9,535 mmol) 1M roztoku NaHMDS. Po 45 minutách byl k vzniklému ylidu přidán roztok 1,1487 mg (10,191 mmol) hexanalu v 10 ml suchého THF. Reakční směs měla žlutooranžové zbarvení. Chlazení probíhalo ještě dalších 30 minut. Pak bylo chlazení vypnuto a směs nechána reagovat za stálého míchání po dobu 24 h za laboratorní teploty. Reakce byla zastavená přidáním 150 ml nasyceného vodného roztoku NH<sub>4</sub>Cl a přeneseno do dělicí nálevky. Roztok NH<sub>4</sub>Cl byl okyselený pomocí konc. HCl na pH = 1. a následně extrahovaný 3× 100 ml CHCl<sub>3</sub>. Chloroformové fáze byly dosušené pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrované, odpařené a přenesené na silikagel. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (Hex/EtOAc - 10:1 + 0,5 % kys. octové). Produktem reakce byla nažloutlá olejovitá kapalina. Celkové množství látky **3** bylo 0,98 g, a to odpovídá výtěžku **35 %**.

### Charakterizace látky 3

Nažloutlý olej

MW: 240,39 g/mol

TLC: (Hex/EtOAc 4:1 + 0,5 % CH<sub>3</sub>COOH), R<sub>f</sub> = 0,22.

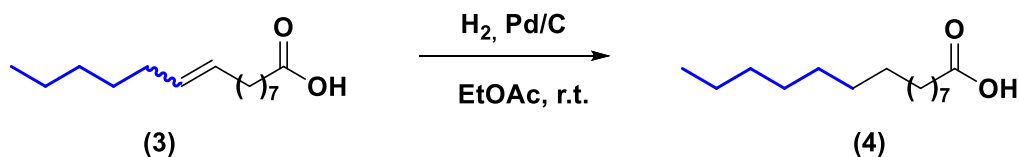
<sup>1</sup>H NMR: (600 MHz, CHLOROFORM-D) δ 10.56 (s, 1H), 5.50 – 5.15 (m, 2H), 2.33 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.04 – 1.92 (m, 4H), 1.67 – 1.57 (m, 2H), 1.40 – 1.19 (m, 15H), 0.95 – 0.80 (m, 3H).

<sup>13</sup>C NMR: (151 MHz, CHLOROFORM-D) δ 180.46, 130.09, 129.80, 34.23, 31.61, 29.76, 29.53, 29.22, 29.14, 29.12, 27.26, 27.23, 24.77, 22.66, 14.13.

IR (ATR): 3005, 2925, 2855, 1709, 1560, 1465, 1412, 1378, 1284, 1247, 1087, 937, 845, 724, 669, 654 cm<sup>-1</sup>



## Pentadekanová kyselina (4)



Do trojhrdlé baňky bylo naváženo 115 mg (0,015 mmol) pentadec-9-enové kyseliny (**3**), která byla rozpuštěna v 50 ml EtOAc, a bylo přidáno 14 mg (0,013 mmol) 10 % Pd/C. Za použití pumpy byl vysátý vzduch nahrazen atmosférou  $\text{H}_2$  (takto opakováno 3×) a za stálého míchání a pod atmosférou  $\text{H}_2$  byla směs nechána reagovat za laboratorní teploty do druhého dne. Druhý den byla směs zfiltrována, propláchnuta pomocí EtOAc a odpařena. Látka nebyla dále nijak čištěna. Výsledná hmotnost látky **4** byla 109 mg a výtěžek reakce byl **94 %**.

### Charakterizace látky **4**

Bílá krystalická látka

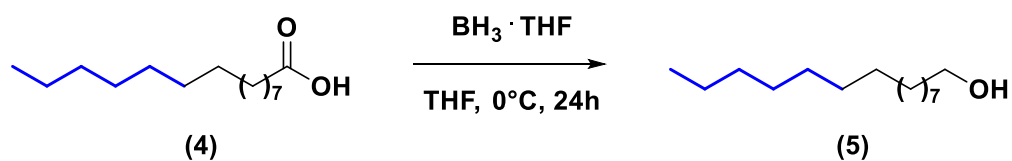
MW: 242,39 g/mol

Teplota tání: 49-52 °C

$^1\text{H}$  NMR: (600 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  2.34 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.66 – 1.57 (m, 2H), 1.35 – 1.18 (m, 22H), 0.87 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).

IR (ATR): 2955, 2917, 2850, 1694, 1473, 1410, 1319, 1298, 1276, 1253, 1230, 1208, 1188, 1118, 1064, 919, 797, 730, 716, 681, 624  $\text{cm}^{-1}$

## Pentadekan-1-ol (5)



Ke 109 mg (0,448 mmol) pentadekanové kyseliny **4** bylo přidáno 5 ml suchého THF a pod inertní atmosférou Ar po kapkách přikapáváno 0,537 ml (0,537 mmol) 1M  $\text{BH}_3$  v THF za chlazení v ledové lázni. Za stálého míchání ponecháno do druhého dne při laboratorní teplotě. Produkt odpařen na vakuové odparce a zbytky  $\text{BH}_3$  byly odstraněny rozpuštěním v methanolu a následným odpařením, a toto bylo zopakováno 3×. Produkt byl dočištěný pomocí sloupcové chromatografie (Hex/EtOAc - 9:1 + 0,5 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Hmotnost produktu byla 84 mg, což odpovídá výtěžku **82 %**.

### Charakterizace látky 5

Bílá krystalická látka

MW: 242,39 g/mol

TLC: (Hex/EtOAc 6:1 +  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ),  $R_f = 0,25$ .

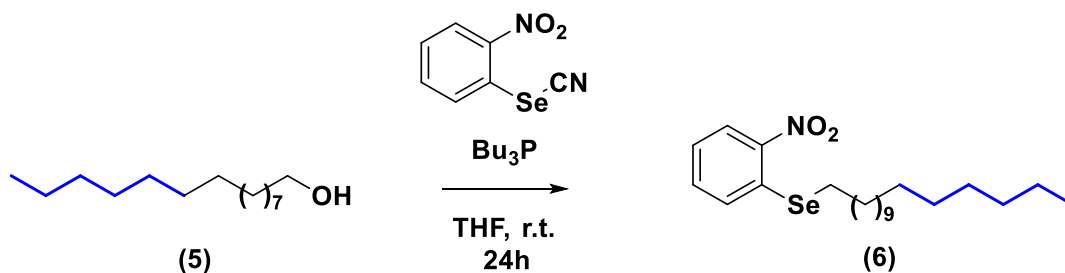
Teplota tání: 37-40 °C

$^1\text{H}$  NMR: (600 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$  3.63 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.59 – 1.49 (m, 4H), 1.38 – 1.19 (m, 22H), 0.87 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR: (151 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$  63.20, 32.91, 32.01, 29.77, 29.74, 29.69, 29.52, 29.44, 25.82, 22.78, 14.20.

IR (ATR): 3273, 2956, 2917, 2849, 1485, 1473, 1462, 1406, 1353, 1323, 1123, 1072, 1062, 1033, 1015, 991, 972, 942, 906, 731, 720, 691, 667, 646  $\text{cm}^{-1}$

## Hexadecyl(2-nitrofenyl)-selenid (6)



K roztoku 449 mg (1,964 mmol) pentadekan-1-olu (**5**) a 669 mg (2,946 mmol) 1-nitro-2-selenokyanatobenzenu (**6**) v 30 ml suchého THF bylo přidáno 0,736 ml (2,946 mmol)  $\text{Bu}_3\text{P}$  za vzniku hnědožluté kapaliny. Pod inertní atmosférou Ar byla reakce míchána za laboratorní teploty po dobu 24 h. Následně byl produkt odpařen se silikagelem a přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (Hex/ $\text{Et}_2\text{O}$  15:1). Celková hmotnost látky **6** byla po zvážení 809 mg, což odpovídá **99 %** výtěžku.

### Charakterizace látky 6

Žluté krystaly

MW: 412,49 g/mol

TLC: (Hex/ $\text{Et}_2\text{O}$  3:1),  $R_f = 0,72$ .

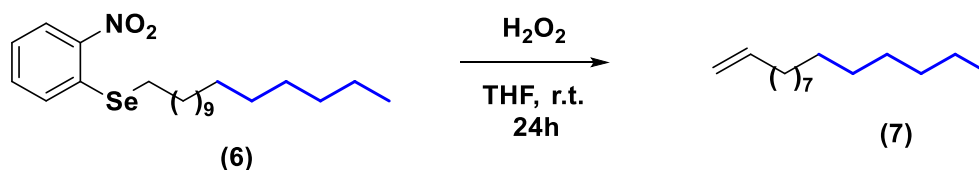
Teplota tání: 51-56 °C

$^1\text{H}$  NMR: (500 MHz, CHLOROFORM- $D$ )  $\delta$  8.33 – 8.27 (m, 1H), 7.56 – 7.48 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 1H), 2.97 – 2.89 (m, 2H), 1.83 – 1.74 (m, 2H), 1.63 – 1.42 (m, 2H), 1.39 – 1.10 (m, 22H), 0.93 – 0.85 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR: (126 MHz, CHLOROFORM- $D$ )  $\delta$  146.85, 134.00, 133.45, 129.01, 126.44, 125.17, 31.91, 30.16, 29.68, 29.66, 29.65, 29.64, 29.62, 29.56, 29.46, 29.34, 29.14, 28.27, 26.28, 22.67, 14.11.

IR (ATR): 2955, 2916, 2851, 1746, 1597, 1564, 1510, 1471, 1451, 1332, 1307, 1256, 1225, 1164, 1153, 1097, 1054, 1039, 852, 779, 769, 702, 678, 667, 647  $\text{cm}^{-1}$

## Pentadec-1-en (7)



K 738 mg (1,79 mmol) látky **6** bylo přidáno 25 ml THF a 1,01 ml (17,90 mmol) 50 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reakce byla ponechána reagovat za stálého míchání 24 hod. Po uplynulém času byla reakce ukončena přidáním 35 ml H<sub>2</sub>O a extrahována 3× 30 ml hexanu. Organická část byla lehce nažloutlá. Následovalo promytí v 10 % roztoku NaHCO<sub>3</sub>. Pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> byla organická část zbavena veškeré zbylé vlhkosti, přefiltrována, odpařena se silikagelem a následně na dočištění našeho produktu byla použita sloupcová chromatografie (Hex). Výsledný produkt **7** vážil 319 mg a výtěžek byl **85 %**.

### Charakterizace látky **7**

Čirý olej

MW: 210,41 g/mol

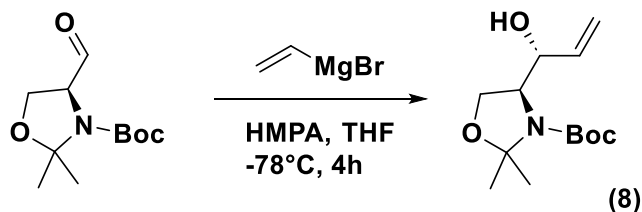
TLC: (Hex) R<sub>f</sub> = 0,93

<sup>1</sup>H NMR: (600 MHz, CHLOROFORM-D) δ 5.85 – 5.76 (m, 1H), 5.02 – 4.87 (m, 2H), 2.07 – 1.99 (m, 2H), 1.41 – 1.33 (m, 2H), 1.31 – 1.18 (m, 20H), 0.87 (t, J = 7.0 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR: (151 MHz, CHLOROFORM-D) δ 139.35, 114.14, 33.91, 32.02, 29.76, 29.71, 29.60, 29.45, 29.25, 29.05, 22.78, 14.19.

IR (ATR): 3077, 2923, 2853, 1748, 1730, 1704, 1688, 1681, 1669, 1641, 1567, 1516, 1506, 1488, 1464, 1417, 1375, 991, 909, 721, 686 cm<sup>-1</sup>

## tert-butyl (S)-4-((R)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (8)



464 mg (2,022 mmol) Garnerova aldehydu bylo rozpuštěno ve 4 ml suchého THF pod inertní atmosférou Ar. Po 30 min chlazení na  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  bylo přikapáváno 10,11 ml (7,077 mmol) 0,7 M roztoku vinylmagnesiumbromidu a 528  $\mu\text{l}$  (3,033 mmol) HMPA. Reakce byla míchaná při snížené teplotě 2 hodiny. Pak bylo chlazení vypnuto a reakce byla nechána za stálého míchání další 2 hodiny v lázni reagovat. Poté byla z lázně vyjmuta a nechána při laboratorní teplotě do druhého dne. Následně bylo do reakční směsi přidáno 15 ml nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a směs byla extrahována  $5 \times 20\text{ ml Et}_2\text{O}$ . Organická vrstva byla dosušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zfiltrována přes filtrační papír a odpařena na vakuové odparce. Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií (Hex/EtOAc - 5:1). Výsledná hmotnost produktu **8** byla 354 mg, což odpovídá výtěžku reakce **69 %**

### Charakterizace látky 8

Nažloutlá tužší olejovitá látka medovitého charakteru

MW: 257,16 g/mol

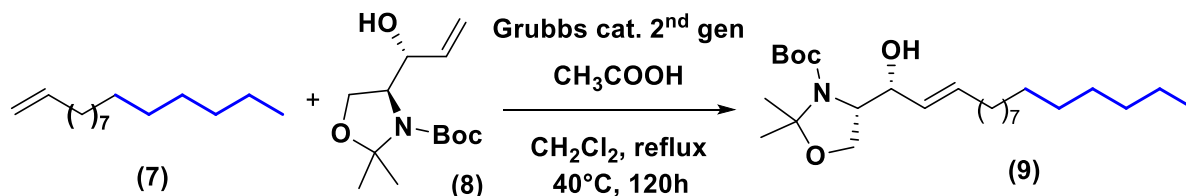
TLC: (Hex/EtOAc 3:1),  $R_f = 0,28$

$^1\text{H NMR}$ : (500 MHz,  $\text{cdCl}_3$ )  $\delta$  5.86 (t,  $J = 14.9\text{ Hz}$ , 1H), 5.41 – 5.31 (m, 1H), 5.26 – 5.19 (m, 1H), 4.23 (d,  $J = 52.5\text{ Hz}$ , 2H), 4.10 – 3.80 (m, 2H), 1.68 – 1.39 (m, 15H).

$^{13}\text{C NMR}$ : (126 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  154.24, 136.66, 116.20, 94.48, 81.17, 74.25, 64.73, 62.01, 29.66, 28.32, 26.22, 24.44.

IR (ATR): 2958, 2930, 2873, 1708, 1633, 1587, 1567, 1541, 1456, 1413, 1380, 1340, 1289, 1240, 1211, 1123, 1110, 1018, 935, 828, 741, 696, 673  $\text{cm}^{-1}$

## tert-butyl (S)-4-((R,E)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (9)



31 mg (0,148 mmol) pentedec-1-enu (**7**) bylo rozpuštěno v 1 ml suchého DCM v inertní atmosféře Ar a dále 40 mg (0,155 mmol) látky (**8**) bylo rozpuštěno v 1 ml suchého DCM a oba roztoky byly přeneseny do 5 ml reaktoru, pak bylo přidáno 3,9 mg (0,0045 mmol) Grubbsova katalyzátoru druhé generace. Pak bylo přidáno po kapkách 8  $\mu$ l (0,142 mmol) kyseliny octové 99 %. Vloženo do lázně a při teplotě 40 °C necháno reagovat 5 dní (120 hod). Po skončení reakce a za sníženého tlaku bylo odpařeno rozpouštědlo a provedena sloupcová chromatografie (Hex/EtOAc - 40:1).

Pro vyšší separaci izomerů bylo potřeba opakované přečištění na sloupcové chromatografii. Celkem bylo získáno 10 mg čistého izomeru s výtěžkem **14 %** a 21 mg směsi dvou diastereomerů a to odpovídá **31 %**.

### Charakterizace látky 9

hnědá tužší olejovitá kapalina

MW: 439,56 g/mol

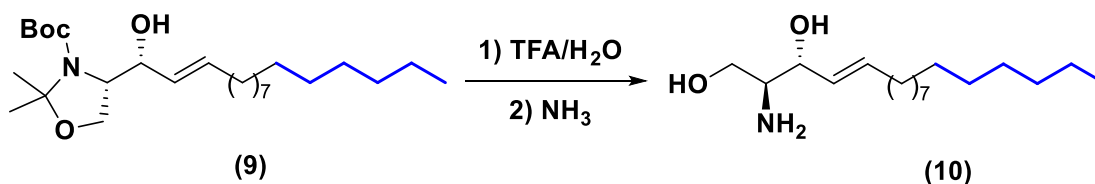
TLC: (Hex/EtOAc 6:1, 0,5 % CH<sub>3</sub>COOH), R<sub>f</sub> (VL) = 0,98, R<sub>fA</sub> (čistý) = 0,54, R<sub>fB</sub> (směs) = 0,51

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  5.80 – 5.70 (m, 1H), 5.49 – 5.41 (m, 1H), 4.37 – 3.77 (m, 4H), 2.09 – 2.01 (m, 2H), 1.68 – 1.43 (m, 15H), 1.27 (m, 22H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR: (151 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  133.53, 94.53, 74.15, 65.03, 63.18, 62.41, 32.84, 32.49, 32.01, 29.77, 29.69, 29.59, 29.44, 29.33, 29.23, 28.46, 26.34, 24.82, 22.78, 14.20.

IR (ATR): 2923, 2853, 1687, 1622, 1587, 1567, 1455, 1439, 1409, 1376, 1365, 1344, 1288, 1245, 1188, 1123, 1019, 968, 829, 829, 724, 715, 695, 673 cm<sup>-1</sup>

## (2*S*,3*R*,*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diol (10)



30 mg (0,068 mmol) látky **9** bylo naváženo do 25 ml srdcové baňky a rozsuspendováno v 0,5 ml H<sub>2</sub>O za chlazení v ledové lázni a pomalu přidáváno 3 ml vodného roztoku TFA (TFA/H<sub>2</sub>O – 3,75:1, v/v). Po 5 minutách od přidání byla lázeň odebrána a směs nechána reagovat 3 h za laboratorní teploty. Zkušební TLC potvrdilo zreagování výchozí látky. Následně byla reakce zastavena přidáním vodného roztoku NH<sub>3</sub> do pH = 9. Vzniklá suspenze byla extrahována 4× 25 ml CHCl<sub>3</sub> a organická fáze promyta nasyceným vodným roztokem NaCl. Vydělená organická fáze byla vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována, odpařena a přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH – 10:1 + 0,5 % TEA). Po dosušení byla výsledná hmotnost sfingosinu 17 mg, a to odpovídá výtěžku **82 %**.

### Charakterizace látky 10

Amorfní hmota

MW: 299,50 g/mol

TLC: (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5:1 + TEA), R<sub>f</sub> = 0,23

<sup>1</sup>H NMR: (600 MHz, CHLOROFORM-D) δ 5.75 (dt, J = 14.3, 6.8 Hz, 1H), 5.42 (dd, J = 15.3, 6.2 Hz, 1H), 4.25 (m, 1H), 3.79 – 3.60 (m, 2H), 3.09 (m, 1H), 2.08 – 1.86 (m, 2H), 1.41 – 1.06 (m, 30H), 0.86 (t, J = 7.0 Hz, 3H).

IR (ATR): 2923, 2852, 1541, 1465, 1404, 1215, 1053, 1053, 971, 757, 721, 662 cm<sup>-1</sup>

## 5 Závěr

Tato práce shrnuje optimalizaci syntézy fyziologického sfingosinu, který by zahrnoval izotopově značený šesti uhlíkatý řetězec. Hlavním cílem práce bylo optimalizovat syntézu takto značené molekuly sfingosinu. Prvním dílčím cílem bylo prověřit, zda je navržený postup vhodný a vede k přípravě cílové molekuly. Syntetická strategie vychází z molekuly L-serinu, který je do molekuly zaveden pomocí Garnerova aldehydu. Tento aldehyd je vinylován a při reakci s terminálním alkenem za podmínek Grubbsovy metateze poskytuje prekurzor sfingosinu. Na závěr jsou již pouze odstraněny ochranné skupiny. Pro přípravu terminálního alkenu byl jako výchozí látka použit komerčně dostupný hexanal (toto je molekula, pomocí které v budoucnu plánujeme do molekuly vnést izotopově značenou část). Tato strategie umožnila dosažení specifické 2*S*,3*R* konfigurace, která je klíčová pro biologickou aktivitu ceramidů. První dílčí cíl byl tedy splněn.

Druhým dílčím cílem bylo optimalizovat reakce tak, aby poskytnuly co nejvyšší výtěžek. Výsledná syntéza byla realizovaná v deseti krocích. Mnoho reakčních kroků se podařilo vyladit tak, že se výtěžek blížil kvantitativnímu. Bohužel některé reakce stále zůstávají komplikované a jejich výtěžek se zatím nepodařilo výrazně zvýšit. Jedním takovým příkladem může být právě Grubbsova metateze, která v našem případě poskytovala výtěžek pouze kolem 14 %, což výrazně snižuje i výtěžek celé syntézy. Celkový výtěžek syntézy tedy dosáhl přibližně 2 %. Vzhledem k tomu, že cílová izotopově značená látka je plánována pro použití jako interní standard, stačí tedy získat pouze malé množství produktu, a i takto na první pohled nízký výtěžek bude dostačující. Druhý dílčí cíl se tedy rovněž podařilo splnit.

Získaný sfingosin bude sloužit k podrobnému studiu sfingolipidů pomocí hmotnostní spektrometrie, což přinese další nové poznatky o chování těchto lipidů ve SC a přispěje k dalšímu výzkumu v oblasti kožní bariéry a lipidového metabolismu.



## 6 Seznam zkratek

AD	atopická dermatitida
ACDáza	alkalická ceramidáza
ACER1	alkalická ceramidáza 1
ACER2	alkalická ceramidáza 2
ACN	acetonitril
BOC	terc-butyloxykarbonyl
C1P	ceramid-1-fosfát
CerS	ceramid syntáza
DCM	dichlormethan
DES	dihydroceramid desaturáza
DMS	dimethylsulfid
DMSO	dimethylsulfoxid
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprej
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GalCer	galaktocerebrosid
HMPA	hexametylfosforamid
IR	infračervená spektroskopie
3-KSDR	3-ketodihydrosfingosin reduktáza
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
NaHMDS	hexamethyldisilazan sodný
NMF	Natural moisturizing factor (přirozený zvlhčující faktor)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDC	pyridinium dichromát
PCC	pyridinium chlorochromát
Rf	retenční faktor
r.t.	laboratorní teplota

S1P	sfingosin-1-fosfát
(S)-GA	Garnerův aldehyd, (S)-terc-butyl-4-formyl-2,2-dimetyloxolidin-3-karboxylát
SC	<i>stratum corneum</i>
SK	sfingosinkináza
SPT	serinpalmitoyltransferáza
TEA	triethylamin
TEWL	transepidermální ztráta vody
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
T <sub>t</sub>	teplota tání

## 7 Použitá literatura

1. Jensen JM, Proksch E. The skin's barrier. *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia*. Dec 2009;144(6):689-700.
2. Druga R, Grim M, Smetana K. *Anatomie periferního nervového systému, smyslových orgánů a kůže*: Galén; 2013.
3. Plzáková Z. Vývoj kůže a její bariérová funkce. *Czecho-Slovak Dermatology/Cesko-Slovenska Dermatologie*. 2021;96(4).
4. Ness MJ, Davis DM, Carey WA. Neonatal skin care: a concise review. *International journal of dermatology*. 2013;52(1):14-22.
5. Kusari A, Han AM, Virgen CA, et al. Evidence-based skin care in preterm infants. *Pediatric dermatology*. 2019;36(1):16-23.
6. Burns T, Breathnach SM, Cox N, Griffiths C. *Rook's textbook of dermatology*: John Wiley & Sons; 2008.
7. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. *Anatomy, skin (integument), epidermis*. 2017.
8. Lopez-Ojeda W, Pandey A, Alhajj M, Oakley AM. *Anatomy, skin (integument)*. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
9. Matejuk A. Skin immunity. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2018;66(1):45-54.
10. Sotiropoulou PA, Blanpain C. Development and homeostasis of the skin epidermis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(7):a008383.
11. Leis K, Mazur E, Jabłońska M, Kolan M, Gałązka P. Endocrine systems of the skin. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*. 2019;36(5):519-523.
12. Hofmann E, Schwarz A, Fink J, Kamolz LP, Kotzbeck P. Modelling the Complexity of Human Skin In Vitro. *Biomedicines*. Mar 2023;11(3).
13. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2548-2556.
14. Chermnykh E, Kalabusheva E, Vorotelyak E. Extracellular matrix as a regulator of epidermal stem cell fate. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4):1003.
15. Abraham J, Mathew S. Merkel cells: a collective review of current concepts. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 2019;9(1):9-13.
16. Jiao Q, Yue L, Zhi L, et al. Studies on stratum corneum metabolism: function, molecular mechanism and influencing factors. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2022;21(8):3256-3264.
17. Tharakan M, Lonczak L. Supporting Skin Structure and Its Barrier Functions with Evidence-Based Skin Care Ingredients. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2024;14(2):200-210.
18. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. Dec 2008;17(12):1063-1072.

19. Vávrová PK. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékárenství*. 2005;1.
20. Rajkumar J, Chandan N, Lio P, Shi V. The skin barrier and moisturization: function, disruption, and mechanisms of repair. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2023;36(4):174-185.
21. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WI. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of cell science*. 2009;122(9):1285-1294.
22. Schurer NY, Plewig G, Elias PM. STRATUM-CORNEUM LIPID FUNCTION. *Dermatologica*. 1991;183(2):77-94.
23. Holleran WM, Feingold KR, Man MQ, Gao WN, Lee JM, Elias PM. REGULATION OF EPIDERMAL SPHINGOLIPID SYNTHESIS BY PERMEABILITY BARRIER FUNCTION. *Journal of Lipid Research*. Jul 1991;32(7):1151-1158.
24. Kishimoto Y. 10 Sphingolipid Formation. *The enzymes*. Vol 16: Elsevier; 1983:357-407.
25. Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*: Elsevier; 1996.
26. Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature Reviews Cancer*. Jan 2018;18(1):33-50.
27. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(6):361-374.
28. Lee M, Lee SY, Bae Y-S. Functional roles of sphingolipids in immunity and their implication in disease. *Experimental & molecular medicine*. 2023;55(6):1110-1130.
29. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(3):175-191.
30. Kuo A, Hla T. Regulation of cellular and systemic sphingolipid homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2024:1-20.
31. Uchida Y, Park K. Ceramides in Skin Health and Disease: An Update. *American Journal of Clinical Dermatology*. Nov 2021;22(6):853-866.
32. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular signalling*. 2008;20(6):1010-1018.
33. Vávrová K, Kováčik A, Opálka L. Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal*. 2017;64(2):28-35.
34. Shayman JA. Sphingolipids. *Kidney international*. 2000;58(1):11-26.
35. Fischer CL. Antimicrobial activity of host-derived lipids. *Antibiotics*. 2020;9(2):75.
36. Bibel D, Aly R, Shah S, Shinefield H. Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin. *Acta dermato-venereologica*. 1993;73(6):407-411.
37. Seitz AP, Schumacher F, Baker J, et al. Sphingosine-coating of plastic surfaces prevents ventilator-associated pneumonia. *Journal of Molecular Medicine*. 2019;97:1195-1211.
38. t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, et al. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2012;84(1):403-411.

39. Geilen CC, Wieder T, Orfanos CE. Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Archives of Dermatological Research*. Sep 1997;289(10):559-566.
40. Uchida Y. Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014;1841(3):453-462.
41. Borodzicz S, Rudnicka L, Mirowska-Guzel D, Cudnoch-Jedrzejewska A. The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids in health and disease*. 2016;15:1-9.
42. Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in lipid research*. 2010;49(2):186-199.
43. Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014;1841(3):422-434.
44. Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*. 2009;91(6):784-790.
45. Zhao X, Wu G, Zhang W, Dong M, Xia Y. Resolving modifications on sphingoid base and N-acyl chain of sphingomyelin lipids in complex lipid extracts. *Analytical Chemistry*. 2020;92(21):14775-14782.
46. Kopitz J. Lipid glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and cell biology*. 2017;147(2):175-198.
47. Hunter CD, Guo T, Daskhan G, Richards MR, Cairo CW. Synthetic strategies for modified glycosphingolipids and their design as probes. *Chemical reviews*. 2018;118(17):8188-8241.
48. Miyagi T, Takahashi K, Yamamoto K, Shiozaki K, Yamaguchi K. Biological and pathological roles of ganglioside sialidases. *Progress in molecular biology and translational science*. 2018;156:121-150.
49. Liao J, Tao J, Lin G, Liu D. Chemistry and biology of sphingolipids. *Tetrahedron*. 2005;61(20):4715-4733.
50. Novotny J, Hrabálek A, Vávrová K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Skin Ceramides. *Current Medicinal Chemistry*. Jul 2010;17(21):2301-2324.
51. Shapiro D, Segal H, Flowers H. The total synthesis of sphingosine<sub>1</sub>. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80(5):1194-1197.
52. Chaudhari VD, Ajish Kumar K, Dhavale DD. An Efficient Synthesis of d-erythro- and d-threo-Sphingosine from d-Glucose: Olefin Cross-Metathesis Approach. *Organic Letters*. 2005;7(26):5805-5807.
53. Torssell S, Somfai P. A practical synthesis of D-erythro-sphingosine using a cross-metathesis approach. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2004;2(11):1643-1646.
54. Murakami T, Minamikawa H, Hato M. Regio- and stereocontrolled synthesis of d-erythro-sphingosine and phytosphingosine from d-glucosamine. *Tetrahedron letters*. 1994;35(5):745-748.
55. Nimkar S, Menaldino D, Merrill AH, Liotta D. A stereoselective synthesis of sphingosine, a protein kinase C inhibitor. *Tetrahedron letters*. 1988;29(25):3037-3040.

56. Schmidt RR, Zimmermann P. Synthesis of D-erythro-sphingosines. *Tetrahedron letters*. 1986;27(4):481-484.
57. Duclos Jr RI. The total syntheses of D-erythro-sphingosine, N-palmitoylsphingosine (ceramide), and glucosylceramide (cerebroside) via an azidosphingosine analog. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2001;111(2):111-138.
58. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Analytická chemie: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*; 2019.
59. Friedecký D, Lemr K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012;20(41):152-157.
60. Gross JH. *Mass spectrometry: a textbook*: Springer Science & Business Media; 2006.
61. De Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and applications*: John Wiley & Sons; 2007.
62. Wigger D, Gulbins E, Kleuser B, Schumacher F. Monitoring the sphingolipid de novo synthesis by stable-isotope labeling and liquid chromatography-mass spectrometry. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019;7:210.
63. Berdyshev EV, Gorshkova IA, Usatyuk P, et al. De novo biosynthesis of dihydrosphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase 1 in mammalian cells. *Cellular signalling*. 2006;18(10):1779-1792.
64. Ecker J, Liebisch G. Application of stable isotopes to investigate the metabolism of fatty acids, glycerophospholipid and sphingolipid species. *Progress in lipid research*. 2014;54:14-31.
65. Berdyshev EV, Gorshkova I, Skobeleva A, et al. FTY720 inhibits ceramide synthases and up-regulates dihydrosphingosine 1-phosphate formation in human lung endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(9):5467-5477.
66. Lee WP. Stable isotopes and mass isotopomer study of fatty acid and cholesterol synthesis: a review of the MIDA approach. *Dietary Fats, Lipids, Hormones, and Tumorigenesis: New Horizons in Basic Research*. 1996:95-114.
67. Skotland T, Ekroos K, Kavaliauskiene S, et al. Determining the turnover of glycosphingolipid species by stable-isotope tracer lipidomics. *Journal of molecular biology*. 2016;428(24):4856-4866.
68. Opalka L, Kovacik A, Sochorová M, et al. Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Organic Letters*. 2015;17(21):5456-5459.
69. Parashar RK. *Reaction mechanisms in organic synthesis*: John Wiley & Sons; 2013;273-276.
70. Hammerschmidt F, Schmidt S. Metallation of Phosphorylated Aliphatic Alcohols to Configurationally Stable  $\alpha$ -Oxyallyllithium Compounds – Use of the Phosphoryl Group as an Activating Group and Electrophile. *European Journal of Organic Chemistry*. 2000;2000(12):2239-2245.
71. Patel S, Mishra B. Chromium (VI) oxidants having quaternary ammonium ions: studies on synthetic applications and oxidation kinetics. *Tetrahedron*. 2007;63(21):4367-4406.
72. Harit H, Hiran B, Joshi S. Kinetics and mechanism of oxidation of primary alcohols by pyridinium dichromate. *Chemical Science*. 2015;4(1):49-58.

73. Eskandari R, Hess JP, Tochtrop GP. Synthesis of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated epoxy ketones utilizing a bifunctional sulfonium/phosphonium ylide. *Chemical Communications*. 2021;57(58):7136-7139.
74. <https://www.chemistrysteps.com/dess-martin-periodinane-dmp-oxidation/> (5.7.2024)
75. Steinhaus M, Sinuco D, Polster J, Osorio C, Schieberle P. Characterization of the aroma-active compounds in pink guava (*Psidium guajava*, L.) by application of the aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(11):4120-4127.
76. Farfán P, Gómez S, Restrepo A. Dissection of the Mechanism of the Wittig Reaction. *The Journal of Organic Chemistry*. 2019;84(22):14644-14658.
77. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/wittig-reaction.shtml> (30.6.2024)
78. Bartoli G, Di Antonio G, Fiocchi R, Giuli S, Marcantoni E, Marcolini M. Synthesis of an (R)-Garner-type Aldehyde from L-Serine: Useful Building Block for a (+)-Furanomycin Derivative. *Synthesis*. 2009;2009(06):951-956.
79. Alcaide B, Almendros P, Luna A. Grubbs' ruthenium-carbenes beyond the metathesis reaction: less conventional non-metathetic utility. *Chemical reviews*. 2009;109(8):3817-3858.
80. Patra SG, Das NK. Recent advancement on the mechanism of olefin metathesis by Grubbs catalysts: A computational perspective. *Polyhedron*. 2021;200:115096.
81. Engberg O, Kováčik A, Pullmannová P, et al. The sphingosine and acyl chains of ceramide [NS] show very different structure and dynamics that challenge our understanding of the skin barrier. *Angewandte Chemie International Edition*. 2020;59(40):17383-17387.