

**Charles University in Prague**  
**Faculty of Science**  
**Department of Organic and Nuclear Chemistry**  
Karlova Universita v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra organické chemie a jaderné chemie



**Mgr. Eva Šťastná**

**Synthesis of Neurosteroids: Modulators of NMDA receptor**  
**Syntéza neurosteroidů: modulátorů NMDA receptoru**

PhD. Thesis Abstract  
Autoreferát disertační práce

Praha 2009  
Prague, 2009



## Scientific Presentations and Posters

### *Papers*

- Šťastná E.: Diazomethane (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>). Synlett, 2007,15,2454.
- Stastna E., Chodounska H., Pouzar V., Kapras V., Borovska J, Cais O., L Vyklicky L.: Synthesis of C3, C5, and C7 pregnane derivatives and their effect on NMDA receptor responses in cultured rat hippocampal neurons. Steroids 2009, 74, 256-263.
- Kapras V., Šťastná E., Chodounská H., Pouzar V., Křištofiková Z.: Preparation of steroid sulfamates and their interaction with GABA<sub>A</sub> receptor. Coll. Czech. Chem. Comm., submitted, manuscript number CCCC/2008/000187.
- Eignerová B., Slavíková B., Buděšínský M., Stastna E., Kotora M.: Synthesis of Fluorinated Brassinosteroids Based on Alkane Cross-Metathesis and Preliminary Biological Assessment. J. Org. Chem., under revision, manuscript number jo-2009-002079.

### *Patents*

- Stastna E., Chodounska H., Cais O., Vyklicky L., Kapras V., Pouzar V., Kohout L.: Steroidní anionické sloučeniny, způsob jejich výroby a jejich použití. Pregnane anionic compounds, the methods of production and their use. Filed 10th July 2008. CZ PV 2008-434.

### *Presentations*

- Šťastná Eva, Pouzar Vladimír, Chodounská Hana: Stability of 7-OH epimers of 3β-hydroxy-5-en steroids. Conference of the Czech Chemical Society 2003. Nymburk, Czech Republic. Chemické listy 2003,97,1128. Awarded „One of the best student lecture of the conference“.
- Eva Šťastná, Hanna Chodounská: Synthesis and hydrophilic derivatization of 3α,7α-dihydroxy-5β-pregnan-20-one. Chemické listy 2005,99,870.
- Hana Chodounská, Jiří Urban, Eva Šťastná, Miloš Buděšínský: Synthesis and hydrophilic derivatization of 3α,7α-dihydroxy-5β-pregnan-20-one. XXI Conference on Isoprenoids. Bialystok-Bialowieza, Poland, 23-29 September 2005. Book of Abstracts, p. 71. Awarded: “One of the five best student lectures without sequence assessment.”

- Eva Šťastná and Hana Chodounská: Utilization of vinyl nonaflates and vinyl triflates in palladium catalysed alkoxyacylation. VII Meeting of young researches in Biology, Biochemistry and Chemistry. Devět Skal, Czech Republic, 12-16 June 2007. Chemické listy 2007, 101, p. 458.

### **Posters**

- Hana Chodounská, Jiří Urban, Eva Šťastná, Miloš Buděšínský: Synthesis of 3-carboxy derivatives of 5 $\beta$ -pregnan-20-one. Conference of the Czech Chemical Society 2004. Nymburk, Czech Republic. Chemické listy 2004,98,1047.
- Hana Chodounská, Jiří Urban, Eva Šťastná, Miloš Buděšínský: Synthesis of 3-carboxy derivatives of 5 $\beta$ -pregnan-20-one. XXI Conference on Isoprenoids. Bialystok-Bialowieza, Poland, 23-29 September 2005. Book of Abstracts, p.62.
- Eva Šťastná and Hana Chodounská: 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-one and 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one: Synthesis and hydrophilic derivatization. VI Meeting of young researches in Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology. Devět Skal, Czech Republic, 14-17 June 2006. Chemické listy 2006,100,407.
- Eva Šťastná and Hana Chodounská: Utilization of vinyl nonaflates and vinyl triflates in palladium catalysed alkoxyacylation. XVI Simposio Nacional de Quimica Organica XVI Sinaqo. Mar del Plata, Argentina, 11-14 November, 2007. Book of Abstracts, p. SO 40.
- Černý I., Šťastná E., Pouzar V., Chodounská H.: Selectivity in reductions of 7-ketosteroids with sodium borohydride. Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – “Liblice 2008”. Chemické listy, 2008,102,1030.

# Curriculum vitae

## General Information

**Name:** Eva Šťastná  
**Born:** on November 28, 1980 in Ostrava (Czech Republic)  
**Nationality:** Czech

**Contact Address:** Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic

**Email:** stastna@uochb.cas.cz

## Education

**1999-2004** **Mgr. degree** in organic chemistry at Charles University in Prague, Faculty of Science. The Diploma work was done at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic under supervision of RNDr. Hana Chodounská CSc.:  
*Synthesis and stability of derivatives of 7-hydroxydehydroepiandrosterone*

**Since Sept. 2004** **PhD. course** in Organic Chemistry, at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic under supervision of RNDr. Hana Chodounská CSc.:  
*Synthesis of Neurosteroids: Modulators of NMDA receptor*

## 1. Introduction

NMDA receptors (N-methyl-D-aspartate) are ligand-gated ion channels permeable to calcium and play a critical role in excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity<sup>1</sup>. They possess distinct binding sites for exogenous and endogenous ligands. These include binding sites for the agonist L-glutamic acid, co-agonist glycine, open channel blockers, polyamines, and also neurosteroids<sup>2</sup>.

L-glutamic acid (glutamate) is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. However, under many pathological conditions the extracellular glutamate concentrations may result in over-excitation, which could induce irreversible processes in neurons including cell death - excitotoxicity<sup>3-6</sup>.

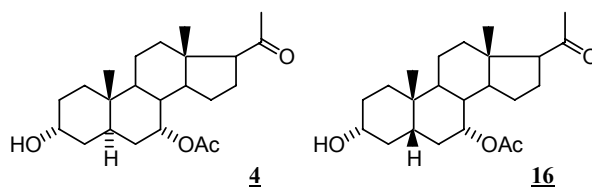
Neurosteroids are compounds synthesized in the nervous tissue from cholesterol and/or from circulating precursors subsequently modified to neuroactive compounds<sup>7</sup>. Without a doubt, a lot of aspects can influence the nature and extent of the neurosteroid modulation. One of them is a chemical structure of neurosteroid. The most important results of structure-activity relationship studies can be summarized as follows<sup>10-12</sup>:

- 20-Oxo-pregn-5-en-3 $\beta$ -yl sulfate (PS), an endogenously occurring neurosteroid, acts as a combined positive and negative modulator of NMDA receptors<sup>8,9</sup>. Nevertheless, the sulfate group is not essential for potentiation of the NMDA response, but a negatively charged group at C-3 is required for activity.
- The hook shaped steroid structures associated with 5 $\beta$ -stereochemistry favors receptor inhibition; whereas the more planar ring structure of 5 $\alpha$ -pregnanes favors potentiation of NMDA receptors.
- The addition of a ketone group at C-7 or C-11 results in complete loss of activity, whereas 11 $\beta$ -hydroxy-PS is weak inhibitor.
- Compounds with modifications to the C-17 side chain, such as 20 $\beta$ -hydroxy-PS and 21-acetoxy-PS, still potentiate the NMDA response. Removal of the ring D side chain, as in dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), markedly attenuated activity.
- 17-Hydroxy-PS, which differs from PS by the presence of a hydroxyl group at C-17, has activity similar to that of PS.

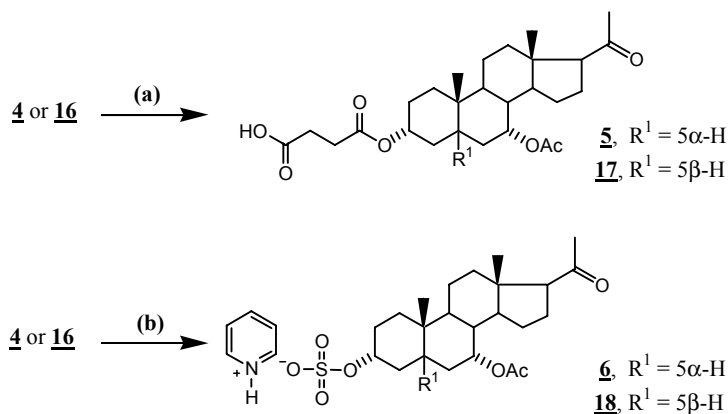
Structure-activity studies on NDMARs which could allow defining a binding site of neurosteroids on NMDARs could facilitate the creation of concept of a molecular template for design and development of novel therapeutic entities.

## 2. Synthesis of C-3 and C-7 Substituted Pregnane Derivatives

The first part of the Thesis was focused on the synthesis of C-3 and C-7 substituted 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -pregnan-20-one derivatives (*Scheme 2* and *3*). In both series, three common methodologies were used to prepare desired products. Firstly, starting compounds **4** and **16** (*Scheme 1*) were treated with succinic anhydride in pyridine under catalysis of 4-dimethylaminopyridine to give desired hemisuccinates **5** and **17** in good yields. Secondly, starting compounds **4** and **16** were treated with sulfur trioxide pyridine complex in chloroform to afford pyridinium salts of sulfates **6** and **18**. And finally, starting compounds **4** and **16** were converted to derivatives **11** and **23** by a sequence of reactions: protection of 3-hydroxy group with *tert*-butyldimethylsilyl group, hydrolysis of 7-acetoxy group, followed by reaction of free 7-hydroxy groups with nicotinoyl chloride hydrochloride and finally, the *tert*-butyldimethylsilyl group was selectively cleaved to hydroxy derivative **10** and **22**. Those were subsequently transformed to pyridinium salts of sulfates **11** and **23**.

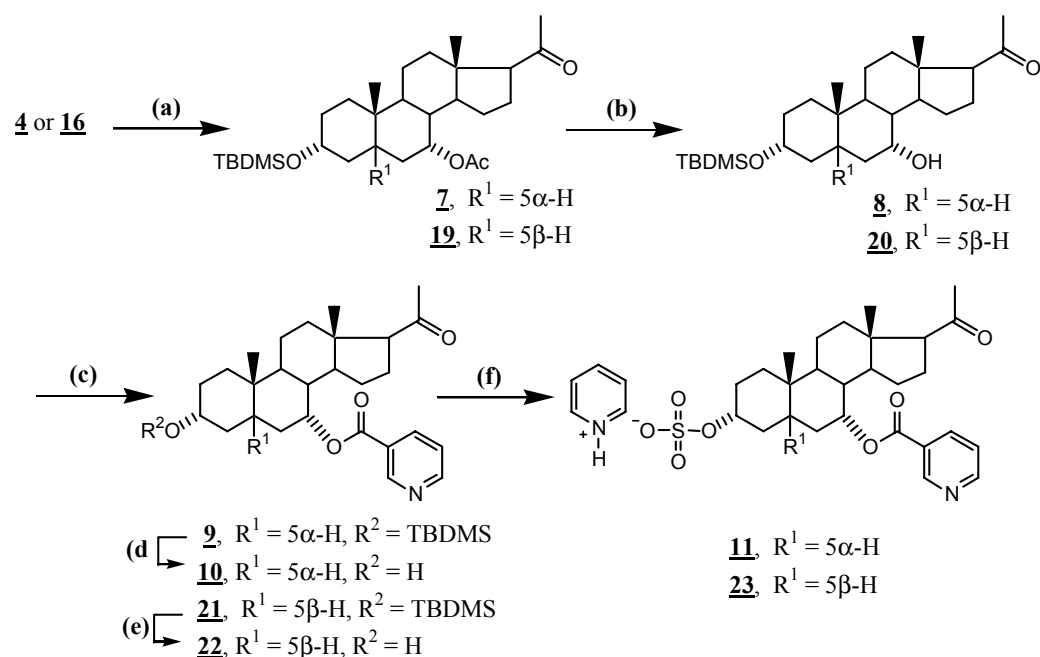


*Scheme 1 – Compounds 4 and 16*



*Scheme 2 - Synthesis of compounds 5, 17 and 6, 18.*

Reaction conditions: (a) Succinic anhydride, pyridine, 4-dimethylaminopyridine, 140 °C; (b) sulfur trioxide pyridine complex, CHCl<sub>3</sub>.



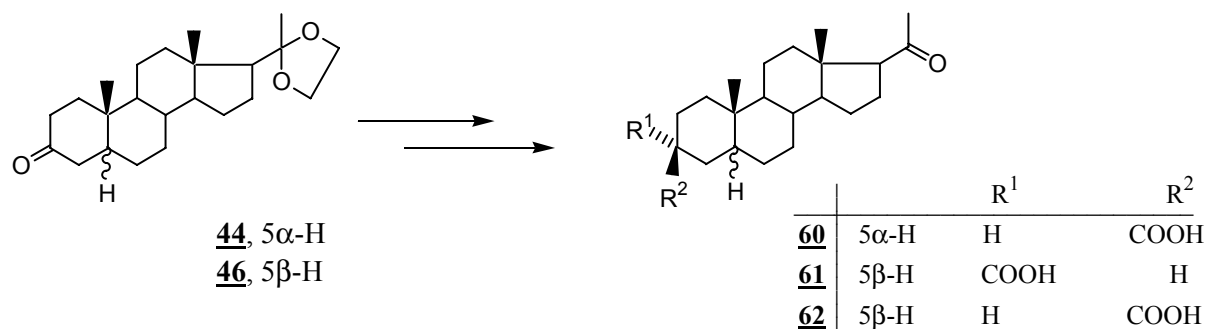
### Scheme 3 - Synthesis of compounds 7-11 and 19-23.

Reaction conditions: (a) *tert*-butyldimethylsilyl chloride, imidazole, DMF; (b) KOH, EtOH, benzene, 60 °C; (c) nicotinoyl chloride hydrochloride, 4-dimethylaminopyridine, pyridine; (d) *p*-toluenesulfonic acid monohydrate, MeOH, rt; (e) tetrabutylammonium fluoride, THF, rt; (f) sulfur trioxide pyridine complex, CHCl<sub>3</sub>.

## 3. Synthesis of 3-Steroid Carboxylic Acids

The second part of the Thesis was focused on the synthesis of 3-steroid carboxylic acids utilizing palladium catalyzed alkoxy carbonylation of steroid triflates and nonaflates (**Scheme 4**). A methodology was firstly examined on cholestane and protected pregnane derivatives. Then, the methodology was utilized on 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -pregnane skeletons (**44** and **46**): 3-keto group was converted to enoltriflates or enolnonaflates which undergo the palladium catalyzed alkoxy carbonylation with carbon monoxide in methanol and DMF to afford unsaturated methyl esters. Catalytic hydrogenation on palladium catalyst followed by basic hydrolysis gave desired carboxylic acids (**60-62**).

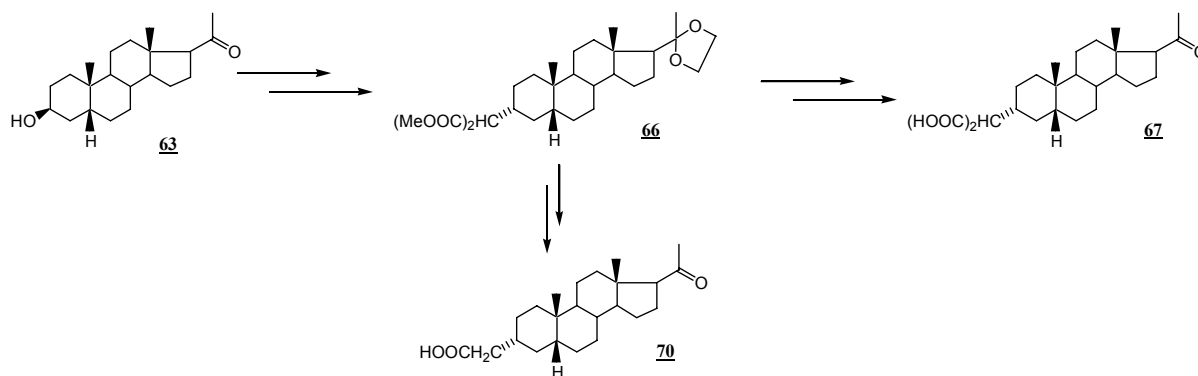




**Scheme 4 – Synthesis of Compounds 60-62.**

#### 4. Synthesis of 2-(Steroid-3-yl)propandioic Acid and 2-(Steroid-3-yl)acetic Acid

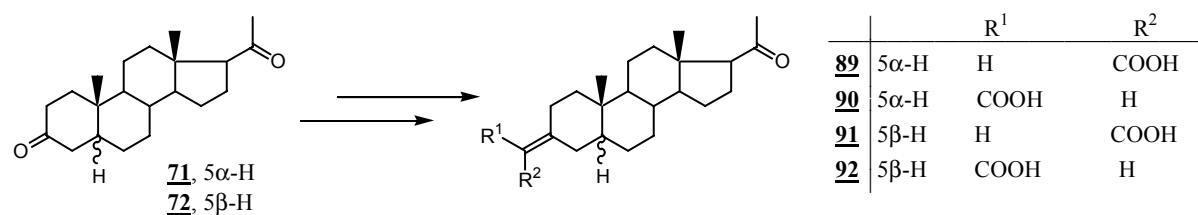
The third part of the Thesis was focused on the synthesis of compounds **67** and **70** (**Scheme 5**): 3-hydroxy group of the starting material **63** was converted to tosylate, 20-keto group was protected as acetal, and finally S<sub>N</sub>2 reaction with sodium salt of dimethyl malonate gave methyl ester of dicarboxylic acid **66**. Basic hydrolysis and deprotection of 20-acetal group afforded diacid **67** and decarboxylation followed by basic hydrolysis and deprotection of 20-acetal gave monoacid **70**.



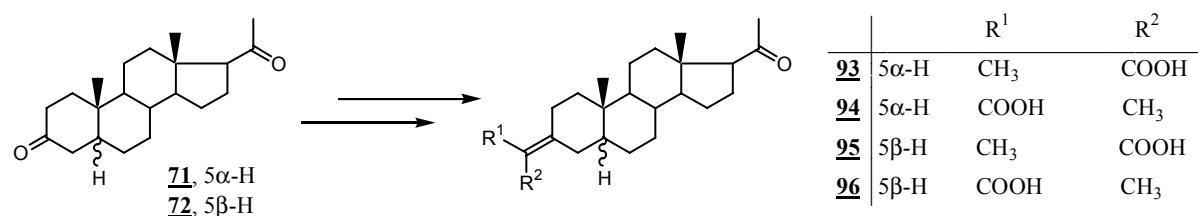
**Scheme 5 - Synthesis of compounds 67 and 70.**

## 5. Synthesis of Steroid Carboxylic Acids via Wadsworth-Horner-Emmons Reaction (WHE)

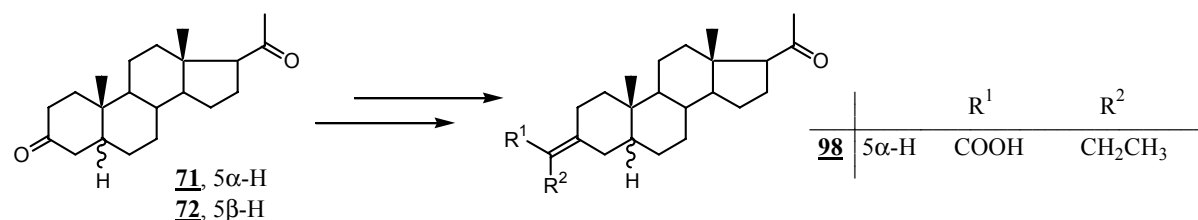
The fourth part of the Thesis was focused on the synthesis of carboxylic acids via Wadsworth-Horner-Emmons reaction (WHE): 3-ketones **71** and **72** were treated with intermediates prepared from commercially available triethyl 2-phosphonoacetate (**Scheme 6**), triethyl 2-phosphonopropionate (**Scheme 7**), triethyl 2-phosphonobutyrate (**Scheme 8**), and triethyl 4-phosphonocrotonate (**Scheme 9**) with NaH in THF at low temperatures to afford particular ethyl esters. Those were then treated with potassium hydroxide to give carboxylic acids except acid **98** which was prepared by acid hydrolysis, because basic hydrolysis led only to isolation of starting material. The hydrolysis did not afford probably due to steric reasons.



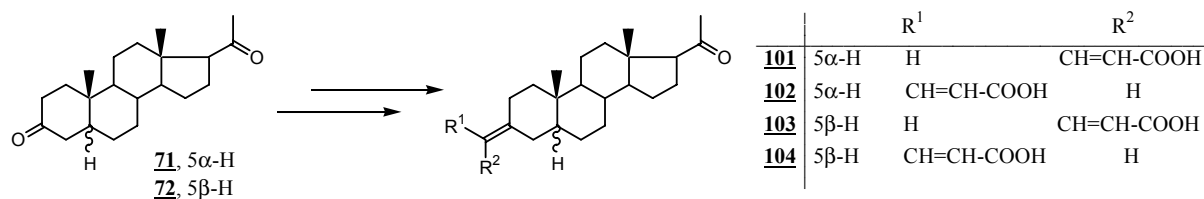
**Scheme 6 – Synthesis of compounds 89-92.**



**Scheme 7 – Synthesis of compounds 93-96.**



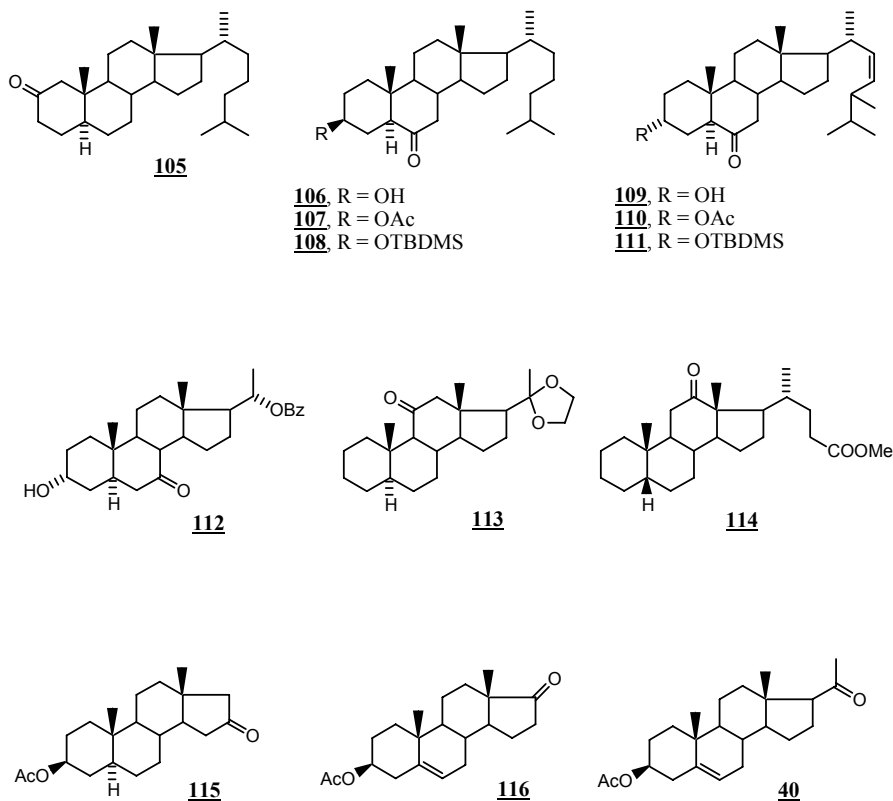
**Scheme 8 – Synthesis of compound 98.**



**Scheme 9 – Synthesis of compounds 101-104.**

## 6. Luche Reduction of Saturated Steroid Ketones

The last part of the Thesis was focused on analysis of steroid alcohols prepared by sodium borohydride reduction of saturated steroids under the conditions of Luche reduction. A series of saturated steroid ketones was reduced by sodium borohydride in a mixture of THF and methanol under the catalysis of cerium chloride heptahydrate (CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O), samarium iodide, and anhydrous cerium chloride. The mixtures of alcohols were firstly analyzed by <sup>1</sup>H NMR and then, the exact ratios were determined by HPLC analysis. The results were compared with results obtained by sodium borohydride reduction in which none catalyst was used. The influence of neighbouring substituents was also discussed.



The sodium borohydride reductions under catalysis of  $Ce^{3+}$  or  $Sm^{3+}$  allow changing of the ratio of axial/equatorial, pseudoaxial/pseudoequatorial, and R/S alcohols. The most significant changes were observed in case of 7- and 12-ketone steroid (**112**, **114**). Considerably promising results were also obtained in case of 20-ketone reduction (**40**) which  $Sm^{3+}$  catalyzed reduction was comparable with results obtained by anhydrous  $Ce^{3+}$  catalysis.

## 7. Conclusions

Within the Thesis I have prepared a series of C-3 and C-7 substituted pregnane derivatives and a series of carboxylic acids of  $5\alpha$ - and  $5\beta$ -pregnan-20-one having carboxylic group joined directly to steroid in position 3 or by spacer of 1-3 carbon atoms. These compounds were tested at the Department of Cellular Neurophysiology at the Institute of Physiology, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic. In general, the results can be summarized as follows: (i)  $5\beta$ -H neurosteroids are rather inhibitors, whereas  $5\alpha$ -H derivatives rather potentiate; (ii) the binding site for steroids on NMDA receptor rather adopt bulky substituents; (iii) the activity of derivative with two carboxylic acids (**67**) did not significantly change in comparison with derivative (**70**) bearing only one carboxyl group; (iv) carboxylic acids prepared via WHE reaction in general potentiate, nevertheless the ambiguous results demand further investigation.

# 1. Úvod

NMDA receptory (N-methyl-D-aspartate) jsou ligandem aktivované iontové kanály propustné pro vápenaté ionty, které hrají klíčovou roli v synaptickém přenosu a jeho plasticitě<sup>1</sup>. NMDA receptory mají odlišná vazebná místa pro exogenní a endogenní ligandy, mezi které patří vazebná místa pro agonistu – L-glutamovou kyselinu, koagonistu – glycin, dále např. Pro blokátory iontového kanálu, polyaminy a také neurosteroidy<sup>2</sup>.

L-glutamová kyselina (glutamát) je hlavní excitační neurotransmitter centrální nervové soustavy. Za určitých patologických podmínek však vysoká koncentrace extracelulárního glutamátu může vést k nadměrné excitaci, jejímž důsledkem mohou být ireversibilní procesy na neuronech, které mohou vést až k buněčné smrti<sup>3-6</sup>. Literatura tento jev popisuje jako tzv. excitotoxicitu.

Termín neurosteroidy označuje skupinu steroidních látek syntetizovaných v nervové tkáni z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů z periferních zdrojů<sup>7</sup>. Charakteristika a míra ovlivnění NMDA receptoru neurosteroidem závisí na mnoha faktorech. Jedním z nich je chemická struktura steroidu. Následující body shrnují současné poznatky strukturálně aktivitních studií vlivu steroidů na NMDA receptory<sup>10-12</sup>:

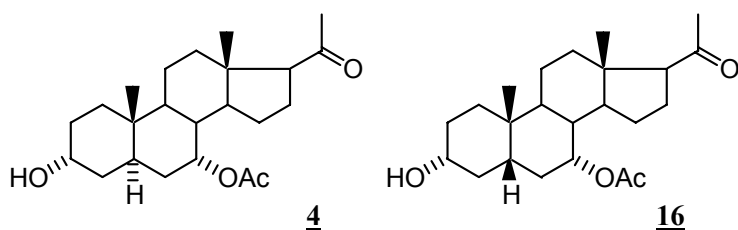
- 20-Oxo-pregn-5-en-3 $\beta$ -yl sulfát (PS), endogenní neurosteroid, působí jako pozitivní i negativní modulátor NMDA receptoru<sup>8,9</sup>. Sulfátová skupina může být nahrazena jiným, negativně nabitým substituentem v poloze C-3 .
- Neurosteroidy s konfigurací 5 $\beta$ -H jsou spíše inhibitory, 5 $\alpha$ -H neurosteroidy spíše potencují odpověď NMDA receptoru.
- 11 $\beta$ -hydroxy-PS je slabý inhibitor, zatímco přítomnost keto skupiny v poloze C-7 nebo C-11 vede ke kompletní ztrátě aktivity.
- Sloučeniny s modifikací 17 $\beta$ -postranního řetězce jako např. 20 $\beta$ -hydroxy-PS a 21-acetoxy-PS potencují odpověď NMDA receptoru. Odtranění postranního řetězce, jako např. 17-oxo-androst-5-en-3 $\beta$ -yl sulfátu (DHEAS), výrazně snížilo aktivitu.
- 17-Hydroxy-PS, který se liší of PS přítomností  $\alpha$ -hydroxylové skupiny v poloze C-17, má srovnatelnou aktivitu s PS.

Studium vztahů mezi strukturou a aktivitou neuroaktivních steroidů na NMDA receptorech by mohlo vést k nalezení vazebného místa, a tak usnadnit vytvoření konceptu

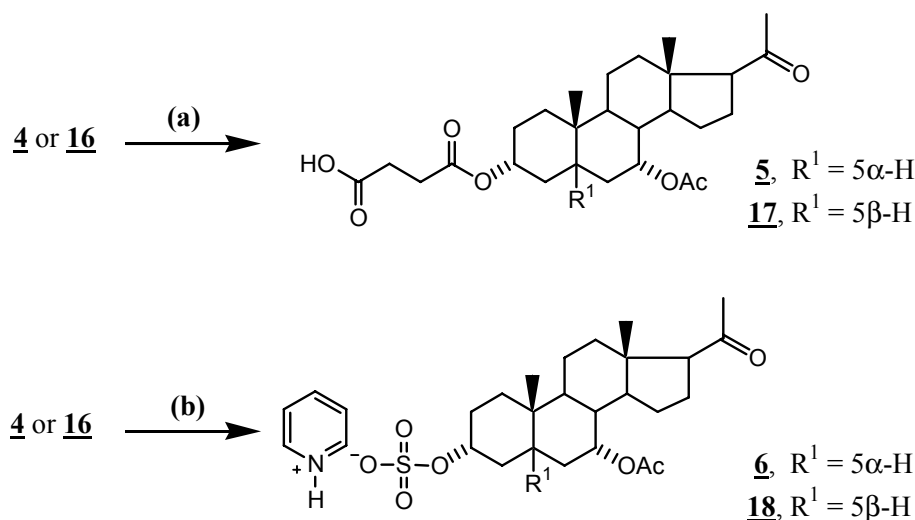
molekulárního templátu pro vývoj nových terapeutických prostředků k medikaci chorob spojených s excitotoxicitou.

## 2. Syntéza C-3 a C-7 substituovaných pregnanových derivátů

V první části dizertační práce byla zaměřena na přípravu C-3 a C-7 substituovaných  $5\alpha$ - a  $5\beta$ -pregnanových derivátů (**Obr. 2 a 3**). Byly použity tři základní reakční sekvence pro přípravu žádaných derivátů. Hemisukcináty **5** a **17** byly připraveny reakcí výchozích látek **4** a **16** (**Obr. 1**) s anhydridem kyseliny jantarové a 4-dimethylaminopyridinem a pyridiniové soli sulfátů **6** a **18** reakcí s komplexem pyridin-oxid sírový. Pro přípravu derivátů **11** a **23** byla použita následující reakční sekvence: 3-hydroxy skupiny byly nejprve ochráněny jako *tert*-butyldimetylsilyl deriváty (TBDMS), 7-acetátové skupiny byly hydrolyzovány, aby posléze byly takto připravené volné 7-hydroxy skupiny ochráněny reakcí s nikotinoyl chloridem hydrochloridem. Volné 3-hydroxylové skupiny, které vznikly štepením chráněných TBDMS derivátů, byly převedeny na pyridiniové soli sulfátů **11** a **23**.

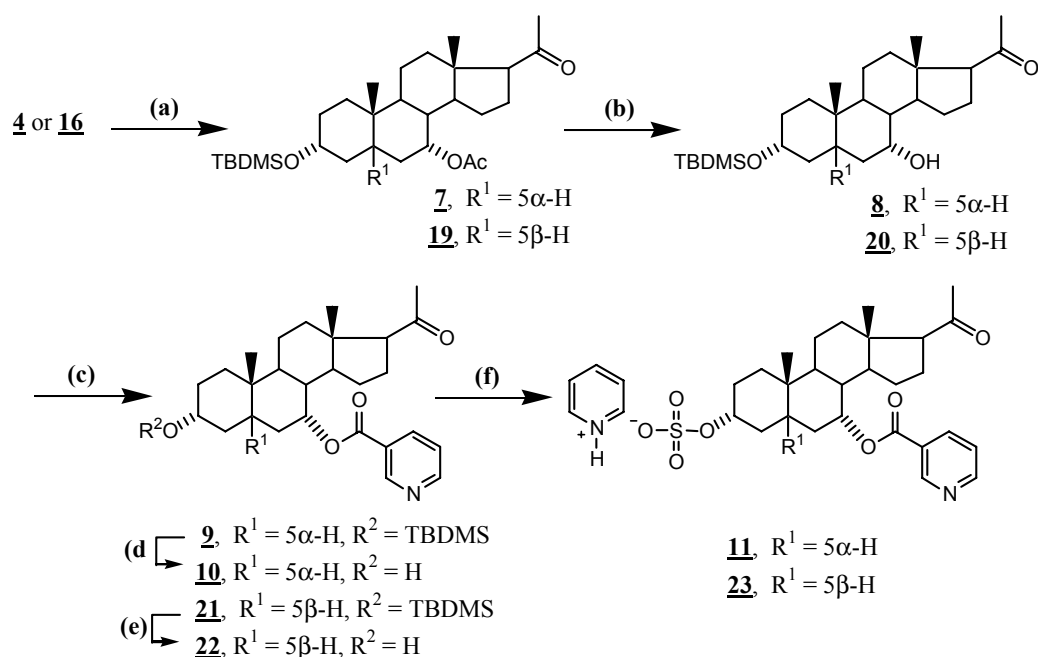


**Obr. 1 – Látky 4 a 16**



**Obr. 2 – Syntéza látek 5, 17 a 6, 18.**

Reakční podmínky: (a) anhydrid kyseliny jantarové, pyridin, 4-dimethylaminopyridin, 140 °C; (b) komplex pyridin-oxid sírový,  $\text{CHCl}_3$ .

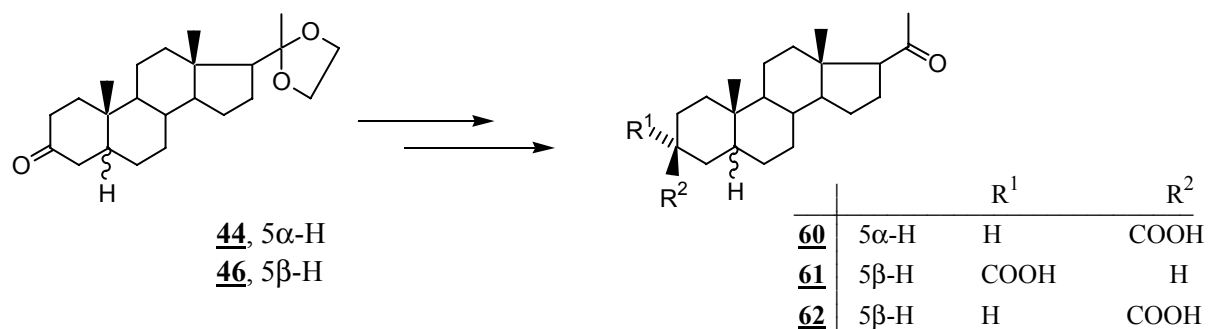


**Obr. 3 – Syntéza látek 7-11 a 19-23.**

Reakční podmínky: (a) *tert*-butyldimethylsilyl chlorid, imidazol, DMF; (b) KOH, EtOH, benzen, 60 °C; (c) nikotinoyl chlorid hydrochlorid, 4-dimethylaminopyridin, pyridin; (d) monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové, MeOH, rt; (e) tetrabutylammonium fluorid, THF, rt; (f) komplex pyridin-oxid sírový, CHCl<sub>3</sub>.

### 3. Syntéza 3-steroidních karboxylových kyselin

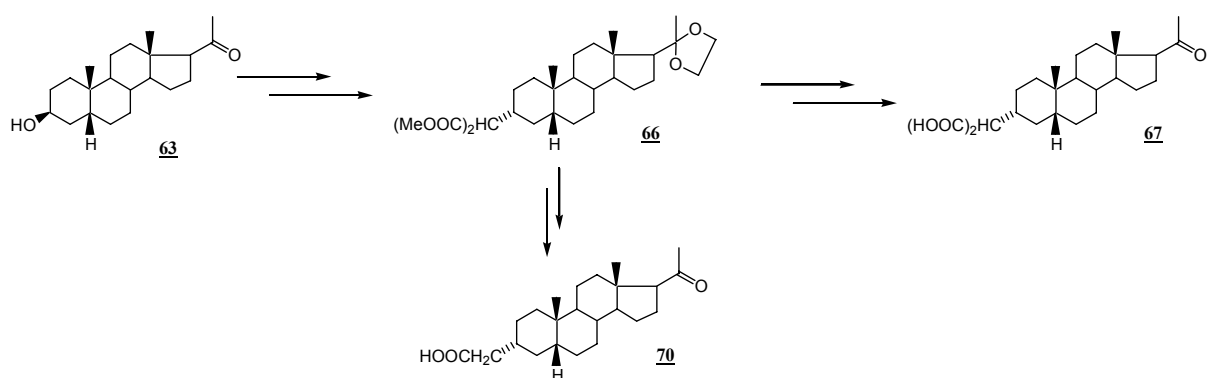
Druhá část dizertační práce byla zaměřena na přípravu 3-steroidních karboxylových kyselin pomocí palladiem katalyzované alkoxykarbonylace triflátů a nonaflátů (**Obr. 4**). Zvolená metodika byla nejprve vyzkoušena na cholestanovém a vhodně chráněném pregnanovém derivátu. Poté byla použita pro syntézu 3-karboxylových kyselin 5 $\alpha$ - a 5 $\beta$ -pregnanových derivátů **44** a **46**: 3-keto skupina byla transformována na směs enol triflátů a enol nonaflátů, které jsou velmi dobrou odstupující skupinou pro palladiem katalyzovanou alkoxykarbonylací oxidem uhelnatým ve směsi metanol-DMF. Takto připravené nenasycené methyl estery byly katalytickou hydrogenací a posléze bazickou hydrolyzou převedeny na požadované karboxylové kyseliny (**60-62**).



**Obr. 4 – Syntéza látek 60-62.**

#### 4. Syntéza 2-(steroid-3-yl)propandiové kyseliny a 2-(steroid-3-yl)octové kyseliny

Třetí část dizertační práce byla zaměřena na přípravu dikarboxylové kyseliny **67** a kyseliny **70** (**Obr. 5**). Nejprve byla 3-hydroxylová skupina výchozí látky **63** ochráněna jako tosylát a 20-keto skupina jako acetal. Reakcí takto připraveného ochráněného derivátu se sodnou solí dimethyl-malonátu za refluxu v toluenu byl získán dimethyl ester **66**. Následná bazická hydrolyza hydroxidem draselným ve směsi voda-etanol a vhodné kyselé zpracování poskytly žádanou dikyselinu **67**. Reakce esteru **66** s kyanidem draselným, hydrolyza a odchránění 20-keto skupiny vedly ke vzniku monolyseliny **70**.

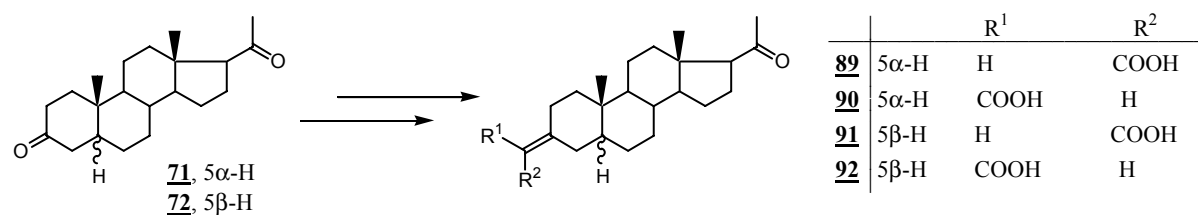


**Obr. 5 – Syntéza látek 67 a 70.**

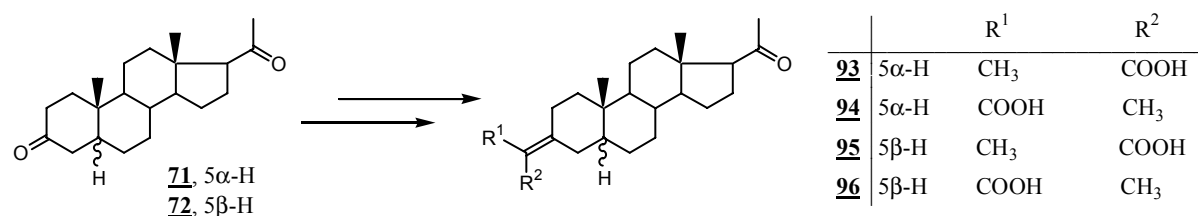


## 5. Syntéza steroidních karboxylových kyselin Wadsworth-Horner-Emmons reakcí (WHE)

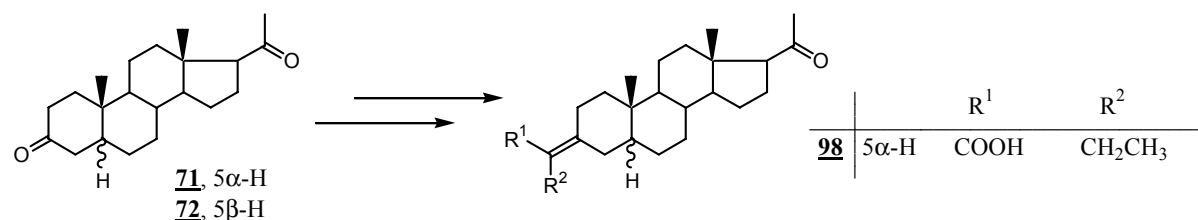
Čtvrtá část dizertační práce byla zaměřena na přípravu steroidních karboxylových kyselin Wadsworth-Horner-Emmons reakcí. Příslušné ethyl estery byly připraveny reakcí 3-keto derivátů **71** a **72** s intermediáty generovanými z komečně dostupných WHE činidel hydridem sodným v THF za nízké teploty. Byla použita následující WHE činidla: triethyl-2-fosfonoacetát (**Obr. 6**), triethyl-2-fosfonopropionát (**Obr. 7**), triethyl-2-fosfonobutyrát (**Obr. 8**) a triethyl-4-fosfonokrotonát (**Obr. 9**). Takto připravené ethyl estery byly následně hydrolyzovány hydroxidem draselným ve směsi etanol-voda za vzniku žádaných karboxylových kyselin. Výjimkou je kyselina **98**, která byla připravena kyselou hydrolyzou, jelikož ethyl ester nepodléhal bazicky katalyzované hydrolyze, pravděpodobně ze sterických důvodů.



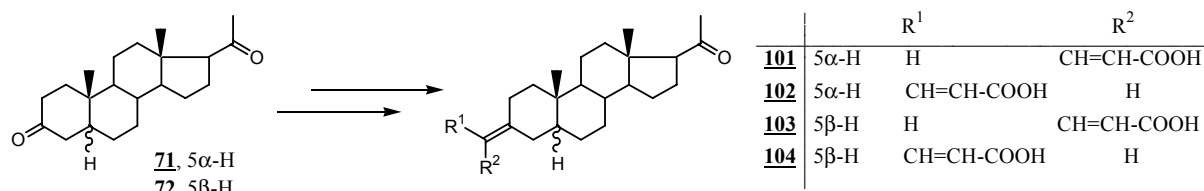
**Obr. 6 – Syntéza látek 89-92.**



**Obr. 7 – Syntéza látek 93-96.**



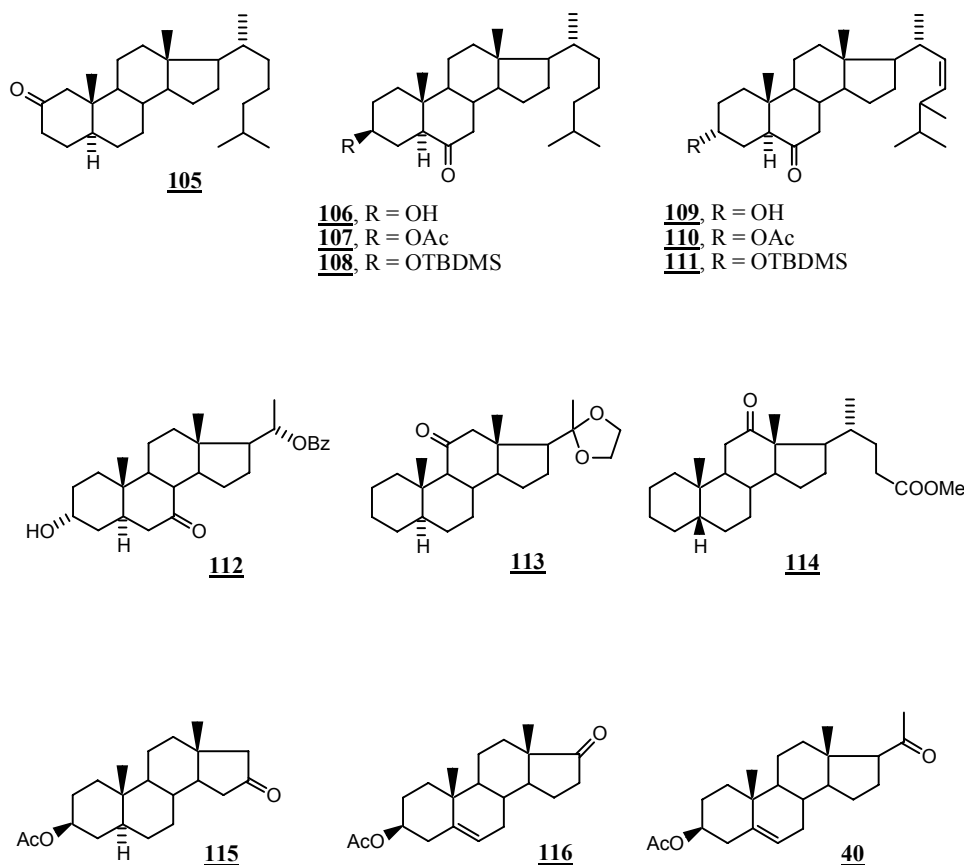
**Obr. 8 – Syntéza látky 98.**



Obr. 9 – Syntéza látek 101-104.

## 6. Lučhova redukce nasycených steroidních ketonů

V poslední části mé dizertační práce jsem se zaměřila na studium podmínek vzniku alkoholů tzv. Lučhovou redukcí tetrahydridboritanem sodným za katalýzy heptahydrátu chloridu ceritého, iodidu samaritého a bezvodého chloridu ceritého ve směsi metanol-THF. Vzniklé směsi axiálních/ekvatoriálních, pseudoaxiálních/pseudoekvatoriálních, resp. R/S alkoholů byly nejprve analyzovány pomocí <sup>1</sup>H NMR spekter a přesný poměr izomerů byl poté určen pomocí HPLC analýzy. Výsledky byly porovnány s poměry alkoholů připravených běžnou redukcí tetrahydridboritanem sodným. Taktéž byl studován vliv sousedních funkčních skupin na poměr vzniklých alkoholů.



Redukce nasycených ketonů za katalýzy  $Ce^{3+}$  nebo  $Sm^{3+}$  umožňuje změnit poměr vznikajících alkoholů. Nejvýraznější změny byly zjištěny v případě redukce 7- a 12-keto steroidů (**112**, **114**). Velmi zajímavé výsledky byly taktéž zjištěny v případě redukce 20-ketonu (**40**) za katalýzy  $Sm^{3+}$ , které jsou srovnatelné s výsledky zjištěnými při použití bezvodého chloridu ceritého.

## 7. Závěr

V rámci dizertační práce “Syntéza neurosteroidů: modulátorů NMDA receptoru” byly připraveny série C-3 a C-7 substituovaných  $5\alpha$ - a  $5\beta$ -pregnanových derivátů a série karboxylových kyselin  $5\alpha$ - a  $5\beta$ -pregnan-20-onu s karboxylovou skupinou navázanou na steroid přímo v poloze 3 nebo navázanou pomocí spojovacího můstku tvořeného 1-3 uhlíkovými atomy. Tyto látky byly testovány na Oddělení buněčné neurofyziologie na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR. Výsledky lze shrnout do několika bodů: (i) obecně lze říci, že aktivita výše uvedených látek je řízena konfigurací na uhlíku C5.  $5\beta$ -H neurosteroidy jsou spíše inhibitory NMDA receptoru,  $5\alpha$ -H neurosteroidy spíše potencují; (ii) vazebné místo pro steroid na NMDA receptoru pravděpodobně vyžaduje deriváty s prostorově objemnějšími substituenty; (iii) aktivita derivátu se dvěma karboxylovými skupinami (**67**) se výrazně nelišila od aktivity derivátu (**70**) s jednou karboxylovou skupinou; (iv) téměř všechny steroidní karboxylové kyseliny připravené WHE reakcí potencují odpovědi NMDA receptoru, výjimkou jsou kyseliny **95**, **96** a **98**. Vysvětlit nejednotné výsledky aktivit této skupiny látek, především však zajímavou aktivitu látky **104** bude vyžadovat další výzkum.

## References / Seznam citací

1. Petrovic M., Sedlacek M., Horak M., Chodounska H., Vyklicky L. Jr.: 20-Oxo-5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ -yl Sulfate Is a Use Dependent NMDA Receptor inhibitor. *J. Neurosci.* 2005,25,8439-8450.
2. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S. F.: The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 1999,51,7-61.
3. Miller S., Kessler J. P., Romano C., Cotman C. W.: Roles of metabotropic glutamate receptors in brain plasticity and pathology. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1995,757,460-474.
4. Doble A.: The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* 1999,81,163-221.
5. Sattler R., Tymianski M.: Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.* 2000,78,3-13.
6. Sattler R., Tymianski M.: Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 2001,24,107-129.
7. Baulieu E. E.: Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 1998,23,963-87.
8. Horak M., Vlcek K., Chodounska H., Vyklicky L.: Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 2006,137,93-102.
9. Malayev A., Gibbs T. T., Farb D. H.: Inhibition of NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NDMA receptors by sulphated steroids. *Br. J. Pharmacol.* 2002,135,901-909.
10. Park-Chung M., Wu F. S., Purdy R. H., Malayev A. A., Gibbs T. T., Farb D. H.: Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol. Pharmacol.* 1997,52,1113-1123.
11. Irwin R. P., Lin S. Z., Rogawski M. A., Purdy R. H., Paul S. M.: Steroid Potentiation and Inhibition of N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Intracellular Ca<sup>++</sup> Responses: Structure-Activity Studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994,271,677-682.
12. Weaver C. E., Land M. B., Purdy R. H., Richards K. G., Gibbs T. T., Farb D. H.: Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca<sup>2+</sup> accumulation and cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000,293,747-754.