

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Kouřilová

NOVÉ MOLEKULY OVLIVŇUJÍCÍ MEMBRÁNOVÉ
PROTEINY

New molecules affecting membrane proteins

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Chodounská, CSc.

Praha 2014

Vznik této práce byl podpořen grantem TE01020028 Centra vývoje originálních léčiv, který je řešen s finanční podporou Technologické agentury České republiky a dále grantem 303/12/1465 od Grantové agentury České republiky, a výzkumným záměrem RVO 61388963.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Hany Chodounské, CSc., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a mimo Ústav organické chemie a biochemie, AVČR, v.v.i. je možné pouze po písemném souhlasu univerzity a tohoto ústavu.

V Praze dne 1. května 2014.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali a pomáhali mi s vypracováním této bakalářské práce. Především bych chtěla poděkovat paní RNDr. Haně Chodounské, CSc. za cenné rady a laskavé odborné vedení, Ing. Barboře Slavíkové za odbornou pomoc a velkou trpělivost a celému týmu Neuroprotektiva, v čele s RNDr. Evou Kudovou, PhD., za pomoc a přátelskou pracovní atmosféru. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Ladislavu Vyklickému, DrSc., Mgr. Barboře Krausové a celému oddělení Buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR. Za určení inhibičních aktivit na glutamátcarboxypeptidáze II bych chtěla poděkovat Mgr. Michalu Navrátilovi z týmu Biochemie a molekulární biologie, v čele s Doc. RNDr. Janem Konvalinkou, CSc.. Velké díky patří také mé rodině, která mě podporovala během celého studia.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	5
1. ÚVOD.....	7
2. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	17
3. SYNTÉZA STEROIDNÍCH KONJUGÁTŮ.....	18
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	23
4.1. Vliv fosfoamidátů na rekombinantní NMDA receptory	23
4.2. Inhibiční efekt steroidních fosfoamidátů k GCPII.	23
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
5.1. Příprava fosfoamidátu – reakce s chráněným glycinem.....	26
5.2. Příprava fosfoamidátu – reakce s chráněnou kyselinou glutamovou.....	30
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	31

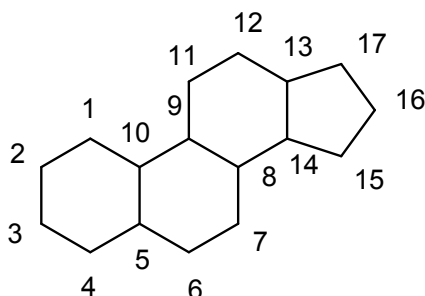
Seznam použitých zkratek

3 α 5 α PA	3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on (allopregnanolon)
3 α 5 β PA	3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-on (pregnanolon)
3 α 5 α PAS	20-oxo-5 α -pregnan-3 α -yl sulfát
3 α 5 β PAS	20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát
AMPA	kyselina α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
CNS	centrální nervová soustava
DHEA	3 β -hydroxy-androst-5-en-17-on (dehydroepiandrosteron)
DHEAS	17-oxo-androst-5-en-3 β -yl sulfát (dehydroepiandrosteron sulfát)
DNA	kyselina deoxyribonukleová
D ₂ O	oxid deuteria
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GABA _A	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou, podtyp A
GABA _B	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou, podtyp B
GABA _C	receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou, podtyp C
GCP II	glutamátcarboxypeptidáza II
iGluR	ionotropní receptor pro kyselinu glutamovou
IR	infračervený (infrared)
KA	kyselina kainová
mGluR	metabotropní receptor pro kyselinu glutamovou
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrum
NAAG	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamová kyselina
NMDA	kyselina N-methyl-D-asparagová
NMDAR	receptor pro kyselinu N-methyl-D-asparagovou
NMR	jaderná magnetická rezonance
PTLC	preparativní tenkovrstvá chromatografie
PS	pregnenolon sulfát
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RT	laboratorní teplota (room temperature)

SN2	bimolekulární nukleofilní substituce
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMSCl	trimethylsilyl chlorid
UV	ultrafialový

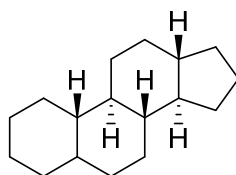
1. Úvod

Steroidy jsou sloučeniny, které jsou biosyntetizovány organismy na téměř všech stupních vývoje, ale dnes jsou také hojně syntetizovány přímo v laboratořích. Podle definice to jsou molekuly s cyklopentanoperhydrofenantrenovým skeletem (Obr. 1).



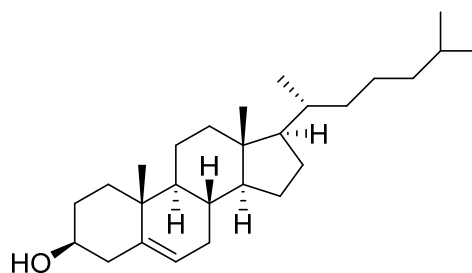
Obr. 1: Cyklopentanoperhydrofenantrenový skelet

Nejjednodušší molekulou je tzv. gonan (Obr. 2), který se v přírodě vůbec nevyskytuje. Nesetkáváme se ale ani s jiným pouze uhlovodíkovým steroidem, kromě zcela výjimečných případů molekul podrobených působení extrémních podmínek, jako je teplota nebo pH. Také uhlovodíková kostra je ve skutečnosti složitější^{1,2,3}.



Obr. 2: Gonan

Nejnámějším příkladem steroidu, který je bohatě zastoupen v lidském organismu je cholesterol (Obr. 3). Svůj název dostal podle řeckých slov znamenajících pevná žluč nebo těž žlučový kámen. Tedy podle prvního zdroje, ze kterého byl izolován. Jde o složitou molekulu, má 8 stereogenních center. Koncem 19. století byl cholesterol poprvé izolován a charakterizován a bylo stanoveno jeho složení⁴. Další velký průlom nastal až ve 30. letech 20. století, kdy byla odvozena konstituce základního uhlíkového skeletu steroidů². Od té doby byly izolovány a charakterizovány desetitisíce steroidních sloučenin. Daleko větší množství bylo připraveno v laboratořích.



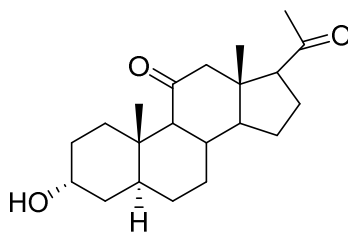
Obr. 3: Cholesterol

Velká variabilita struktur s sebou nese i velkou variabilitu biologických a farmakologických vlastností.

Nejdéle známý steroid – cholesterol, je důležitou součástí buněčných membrán a je základní stavební látkou pro biotransformaci ve všechny další steroidy⁵. V patologických podmínkách se ukládá v krevním řečišti a jeho krystaly způsobují arteriosklerózu, která v krajních případech může vést k infarktu myokardu, či mozkové mrtvici a úmrtí. Dlouho známé jsou také žlučové kyseliny, nezbytné pro trávení tuků. Z cholesterolu vzniká působením UV záření o vhodné vlnové délce vitamín D. Jeho nedostatek se projevuje zejména špatným růstem kostí, ale také například náchylností k novotvarům plic a dalšími četnými problémy. Steroidní základ – konkrétně pregnanový, mají také kortikoidy ovlivňující hospodaření organismu s vodou, minerály a glukosou. Steroidy jsou ale především všeobecně známé jako pohlavní hormony s důležitou úlohou ve vývoji pohlavního ústrojí i druhotných pohlavních znaků⁶. Vlivem zlepšení dostupnosti steroidů pro širokou veřejnost a především jejich zneužívání zejména sportovci došlo k rozpoznání účinků steroidů na centrální nervovou soustavu. Při zneužívání anabolických steroidů se měnila osobnost sportovce. Tito jedinci začali podléhat náhlým změnám nálady. Byli impulzivní až agresivní.

Nejvýznamnějším zdrojem informací a poznání byly ovšem pokusy Hanse Selye, rodáka z Vídně a absolventa pražské německé univerzity, který byl nucen kvůli svým židovským předkům opustit Rakousko, které bylo v té době okupováno fašistickým Německem. Emigroval do Kanady, kde se zabýval výzkumem fyziologické reakce organismu na stres. Často bývá nazýván „otec stresu“. Díky svému výzkumu objevil, že při reakci na nepříznivý fyzický či psychický podnět se zvyšuje hladina kortikoidů v organismu, čímž dochází ke zbrzdění glukoneogeneze, zvýšení krevního tlaku a dalším „opatřením“, které mají jedince připravit na boj či útěk. Opačné účinky – uklidňující až

hypnotické, má rychlá infuze redukovaných derivátů pregnanu. Na základě těchto studií bylo vyvinuto celkové anestetikum a narkotikum alfaxalon (Obr. 4).



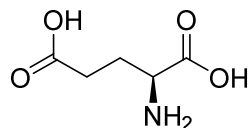
Obr. 4: Alfaxalon

Během výzkumu mechanismu účinku alfaxalonu zjistil francouzský vědec Baulieu se svými spolupracovníky, že alfaxalon je 11-oxo-derivát 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-onu, přirozeně se vyskytujícího v nervové tkáni. Tuto látku nazval epalon⁷. Mozek si epalon, spolu s dalšími příbuznými deriváty, dokáže biosyntetizovat sám pro svou vlastní potřebu a zároveň ho dokáže velmi efektivně metabolicky deaktivovat.

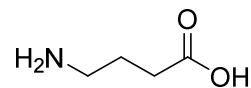
Klasický mechanismus působení steroidů, například na růst svalů, je realizován přes aktivaci jaderných receptorů, která vyvolává syntézu bílkovin. Steroidy jsou transportovány krevním řečištěm až do cílových tkání. Zde dochází k proniknutí dovnitř buňky a specifickému navázání na receptorové proteiny. Tím vzniká komplex steroidní hormon-receptor. Po přesunu vzniklého komplexu do buněčného jádra dochází k ovlivnění genové transkripce. Vazebný komplex, který se navázal na bílkovinný represor, uvolní blokovanou DNA a tím dochází k tvorbě mRNA a dále potom tvorbě enzymů na ribozomech. Tato aktivita je v organismu patrná v časovém intervalu dní až týdnů.

V mozku je působení steroidů velmi rychlé. Zde se jedná o nástup účinku v řádu milisekund. Toto by klasický mechanismus neumožňoval. Uplatňuje se zde takzvaná membránová aktivita, kdy dochází k modulaci nervového vzruchu díky steroidům a to tak, že změní propustnost transportních kanálů pro ionty v membráně nervových buněk. Tyto kanály jsou spojeny se specifickými receptory pro malé molekuly, které jsou metabolicky odvozené většinou od aminokyselin a označujeme je jako neurotransmitery. Neurotransmitery jsou uvolňovány presynaptickým neuronem a přenášejí nervový impuls přes synaptickou štěrbinu prostřednictvím receptorů do postsynaptického neuronu⁶.

Nejvíce zastoupenými neurotransmitery v centrální nervové soustavě (CNS) jsou kyselina L-glutamová, která zjednodušeně řečeno aktivuje neurony a kyselina γ -aminomáselná (GABA), které jsou znázorněny na obrázku 5.



Kyselina L-glutamová

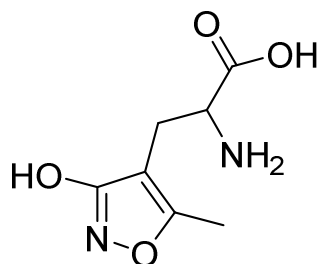


Kyselina γ -aminomáselná

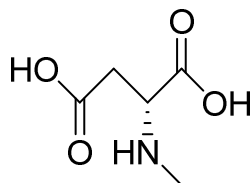
Obr. 5

GABA se váže na neuronální receptor nazvaný po této kyselině a aktivuje činnost iontové pumpy pro chloridové anionty. Tím dochází k hyperpolarizaci membrány a následnému tlumení nervového signálu. Steroidy jsou schopné činnost receptoru modulovat. Buď zesilují akci neurotransmiteru, nebo aktivitu inhibují v závislosti na struktuře. Působení steroidů na GABA_A receptoru bylo popsáno v roce 1989⁷. GABA receptor potencují například barbituráty či benzodiazepiny, ale steroidy jsou podle literatury ve srovnání s těmito farmaky účinnější⁷. Receptory aktivované GABA můžeme rozdělit do tří základních skupin. První skupinou jsou ionotropní GABA_A receptory, které tvoří kanál přímo pro chloridové anionty. Dále to jsou metabotropní GABA_B receptory, které jsou spřažené prostřednictvím G-proteinů s kanály pro sodné a draselné kationty. Poslední skupinou jsou GABA_C receptory, které tvoří také chloridový iontový kanál, ale liší se od GABA_A podjednotkovým složením, distribucí v organismu i svými farmakologickými vlastnostmi. GABA_A receptory jsou tvořeny pěti transmembránovými podjednotkami. V současné době se odhaduje existence přibližně 30 typů GABA_A receptorů s odlišným podjednotkovým složením. To pak zásadně ovlivňuje vlastnosti receptoru, jako je například citlivost ke GABA a další farmakologické charakteristiky⁸. Dalším, dokonce častějším neurotransmiterem je kyselina glutamová. Podle současných znalostí je asi 50 % všech synapsí glutamatergních. Presynaptické uvolňování kyseliny L-glutamové a její následná vazba do postsynaptických receptorů, která umožní vstup vápenatých a dalších kationtů do neuronů, je za fyziologických podmínek nezbytná pro správné fungování centrální nervové soustavy. Tento děj je důležitý například pro proces učení a tvorby paměťových stop. Glutamát aktivuje tři skupiny ionotropních - ligandem řízených receptorů (iGluR). Všechny skupiny receptorů mají iontové kanály propustné pro kationty-draselné, sodné a vápenaté. Propustnost pro vápenaté ionty je ovšem pro každý typ receptoru různá, v závislosti na podjednotkovém složení receptoru. Jména základních

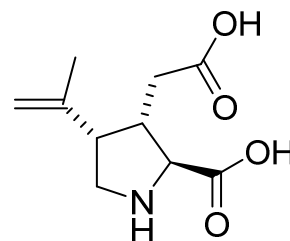
ionotropních receptorů jsou odvozena pomocí farmakologických vlastností receptorů od specifických syntetických agonistů (obr. 6), které se vážou na daný specifický podtyp receptoru a tím selektivně otevírají související iontový kanál. Mluvíme tedy o kainátových receptorech, aktivovaných kainátem (KA), AMPA receptorech, aktivovaných α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátovou kyselinou a NMDA receptorech, aktivovaných N-methyl-D-asparagovou kyselinou^{8,9}.



Kyselina α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová (AMPA)



Kyselina N-methyl-D-asparagová



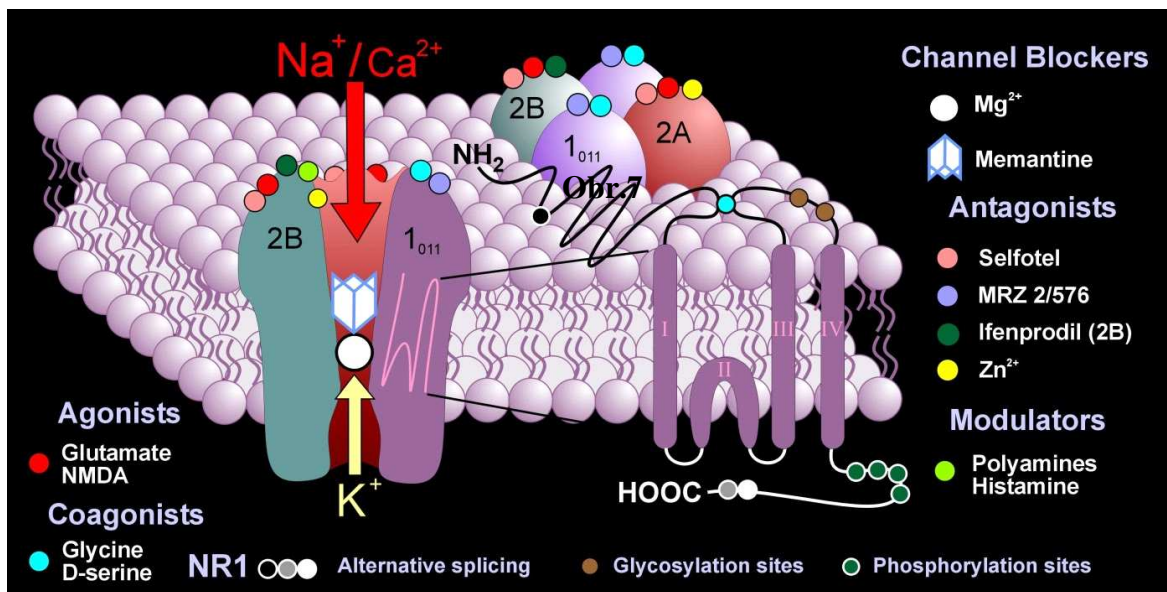
Kyselina kainová

Obr. 6

Glutamát je také schopen aktivovat jinou skupinu receptorů, tzv. metabotropních (mGluR). Ty jsou spojeny s přenosem signálu cestou proteinů vážících guaninový nukleotid, tzv. G-proteinů. Následné změny sekundárních posílů aktivují synaptický přenos pomaleji ve srovnání s ionotropními receptory^{10,11}.

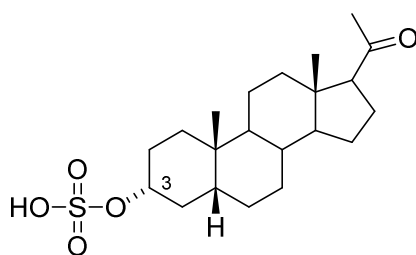
Významné jsou pro nás především ionotropní NMDA receptory, jejichž struktura je znázorněna na Obr. 7¹². NMDA receptory mají vysokou propustnost pro vápenaté ionty, stejně tak jsou ale propustné i pro ionty sodné a draselné. Touto vlastností mají vliv na celou řadu nitrobuněčných procesů. NMDA receptor je nejrozšířenější receptor v centrální

nervové soustavě savců. Tyto receptory jsou umístěny přímo na neuronech, ale i na gliových buňkách. Některými svými biologickými vlastnostmi se velice odlišuje od ostatních ionotropních receptorů. Ukázkou této odlišnosti je například fakt, že k jeho aktivaci je potřebný nejen glutamát, ale současně i koagonista glycin. Přestože dojde k jeho aktivaci, je aktivní jen málo. Dochází k zablokování iontového kanálu hořečnatými ionty. Pokud je neuron depolarizován, jsou následně hořečnaté ionty z kanálu uvolněny a aktivita receptoru se začne zvyšovat^{8,13}.

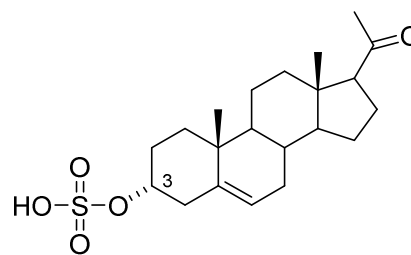


Obr. 7: NMDA receptor

Znakem, který je společný pro endogenní neurosteroidy, u kterých byl prokázán přímý vliv na NMDA receptor, je přítomnost sulfátové skupiny navázané v poloze C3. Tato sulfátová skupina je pro účinek steroidu nepostradatelná, jelikož nese záporný náboj. Na Obr. 8 jsou znázorněny příklady endogenních neurosteroidů 3 α 5 β PAS a PS. Tyto dvě látky ovšem působí odlišně na GABA_A a NMDA receptory. Zatímco účinek PS na GABA_A receptor je inhibiční, na NMDA receptor má silně potenciační účinek. Naopak působení 3 α 5 β PAS odpovědi NMDA receptorů inhibuje tak, že sníží pravděpodobnost otevírání iontových kanálů.



3 α ,5 β -pregnanolonsulfát



Pregnenolon sulfát (PS)

Obr. 8

Výrazný rozdíl v působení neurosteroidů na receptory působí také podjednotkové složení daného receptoru^{6,8}.

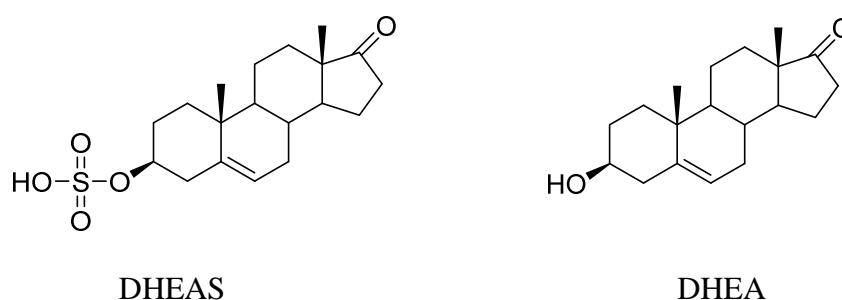
Základním mechanismem působení neurosteroidů na modulaci GABA_A a NMDA receptorů je změna pravděpodobnosti otevření příslušného iontového kanálu. Účinky různých neurosteroidů na oba typy receptorů můžeme pozorovat jak potenciační tak inhibiční, v závislosti na struktuře steroidu. Některé tyto účinky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Důležitou roli zde hraje konfigurace na chirálních uhlících C3 a C5.

Tabulka 1: Přehled účinků vybraných neuroaktivních steroidů na funkci GABA_A a NMDA receptorů (↑ = potenciace, ↓ = inhibice)^{14,15,16}.

steroid	receptor	
	GABA _A	NMDA
3 α 5 α	↑	-
3 α 5 β	↑	-
3 α 5 α S	↓	↓
3 α 5 β S	↓	↓
PS	↓	↑

Zjištěné poznatky o působení neurosteroidů na ionotropní receptory pro nás mají význam při vývoji terapeuticky významných analogů. Mnoho studií dokazuje, že tyto látky silně ovlivňují např. schopnost se učit či reakci na stres, úzkost a agresivitu. Pokusy na laboratorních zvířatech bylo například zjištěno, že akutní stres souvisí s rychlým

reverzibilním poklesem aktivity GABA_A receptorů, doprovázeným zvýšením hladiny neurosteroidů, pozitivně modulujících tyto receptory. Můžeme předpokládat, že podobné procesy probíhají i u lidí. U NMDA receptorů byly testovány sulfátové neurosteroidy, které je pozitivně modulují, naopak negativně modulují GABA_A receptory. Příkladem těchto látek je již zmíněný PS nebo DHEAS, které dokáží výrazně zlepšovat kognitivní schopnosti u experimentálních zvířat. Byla prokázána souvislost mezi sníženou hladinou PS v hipokampu u starších potkanů, u kterých došlo ke zhoršení výkonů během paměťových testů. Po injekčním podání PS se jejich výkony přechodně zlepšily. Obecně můžeme předpokládat, že prostřednictvím pozitivní modulace NMDA receptorů nebo naopak negativní modulací GABA_A receptorů dochází ke zlepšení kognitivní schopnosti. Klinické studie probíhaly zejména pro neurosteroidy DHEA a DHEAS, které jsou v plazmě a mozkomíšním moku člověka zastoupeny nejvíce (Obr. 9). Konkrétně DHEA je po cholesterolu nejrozšířenějším steroidem v lidském těle³. S přibývajícím věkem člověka dochází k poklesu koncentrace těchto neurosteroidů. Pozitivní výsledky aplikace zmíněných dvou látek na zvířecích modelech vedou k úvahám o možných souvislostech při léčbě neurodegenerativních onemocnění, která jsou častá ve vysokém věku člověka. Bohužel zatím získané výsledky nejsou zcela jednoznačné a liší se v jednotlivých dostupných studiích. Jedna pozitivní studie však dokazuje přímou souvislost koncentrace DHEA a paměťové schopnosti. Tato látka byla podána pacientům, u kterých byla prokázána snížená hladina DHEA. Následně došlo ke zlepšení jejich paměťových schopností^{8,9}.



Obr. 9

Aktivita steroidů na membránových neuronových receptorech je podmíněna jejich vlastnostmi, kdy jako látky s lipofilními zónami molekuly mohou s membránami interagovat. Stejně vlastnosti se uplatňují i při účinnosti na další membránové proteiny. Takovým proteinem je i glutamátcarboxypeptidáza II.

Proteázy jsou enzymy, které jsou schopné štěpit peptidovou vazbu. Tyto molekuly hrají významnou roli v řadě biologických pochodů. Jednou z nejvýznamnějších proteáz vyskytujících se v řadě tkání nejen u člověka, ale také u zvířat, je glutamátcarboxypeptidáza II (GCPII). Tento enzym najdeme v lidském organismu zejména v centrální nervové soustavě, tenkém střevě a prostatě. Jedná se o membránový glykoprotein, který je tvořen 750 aminokyselinami. Tento enzym řadíme mezi metalopeptidázy, protože má v aktivním místě navázány dva atomy zinku nezbytné pro jeho enzymovou aktivitu^{17,18}.

Enzym GCPII i jeho aktivita byly objevovány postupně různými laboratořemi ve světě, proto v jeho názvosloví došlo v období, než bylo jednoznačně potvrzeno, že se jedná o stejnou molekulu v různých tkáních, k určité mnohokolejnosti. Nejdříve byl studován GCPII vyskytující se ve střevní sliznici, kde se tento enzym podílí na štěpení špatně vstřebatelného substrátu - poly-glutamylovaného folátu. Tímto štěpením vzniká kyselina listová, nezbytná pro syntézu nukleových kyselin, významnou roli hraje při krvetvorbě a dále je důležitá pro normální vývoj a růst plodu, zejména v bezprostředním časovém intervalu před a po početí. Z této aktivity, štěpení poly-glutamylovaného folátu, byl odvozen název, a to folát hydroláza. Dalším místem tvorby a působení enzymu GCPII byla prostata. Místo nálezu vedlo k odvození asi nejvíce používaného názvu- PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen). PSMA byl jako nádorový marker identifikován na konci 80. let minulého století. V následujících letech byla popsána tzv. PSM-forma. Zdravá tkáň prostaty produkuje zejména tuto formu, která je s největší pravděpodobností enzymaticky inaktivní. Jakmile dojde ke vzniku nádorového onemocnění prostaty, dojde ke změně poměru mezi inaktivní PSM-formou a enzymaticky aktivní PSMA ve prospěch této aktivní formy. Můžeme se proto domnívat, že PSMA má přímou souvislost s karcinogenezí v prostatě.

V lidském mozku štěpí tento enzym jeden z neurotransmiterů-N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG). Tímto štěpením uvolňuje glutamát, který hraje důležitou roli v řadě patologických stavů. Následné experimenty prokázaly, že pokud dojde k inhibici GCPII, dojde ke zmenšení neurologického poškození při ischemickém postižení, jako je cévní mozková příhoda, dále diabetická neuropatie či Alzheimerova choroba. Experimenty na laboratorních zvířatech prokázaly, že struktura tohoto enzymu může být základem pro vývoj nových léků s neuroprotektivním účinkem, který je založen na inhibici GCPII¹⁹.

V roce 1998 došlo ke všeobecnému konsenzu. Bylo dohodnuto, že všechny výše uvedené aktivity jsou projevem jediného proteinu. Pro něj byl navržen systematický název glutamátcarboxypeptidáza II, který zároveň vystihuje jeho enzymatickou funkci. Ostatní názvy se ovšem paralelně používají nadále¹⁸.

GCPII představuje z medicínského pohledu velice zajímavou molekulu. Jedná se o vysoce specifický buněčný nádorový marker pro karcinom prostaty a dále je prokázána jeho souvislost s neurologickým postižením.

Nalezení inhibitoru tvorby glutamátu a zároveň inhibujícího receptoru glutamátem aktivovaného, by mohlo vést k zatím chybějícímu přípravku pro příznivé ovlivnění nemocí poškození CNS.

2. Cíle bakalářské práce

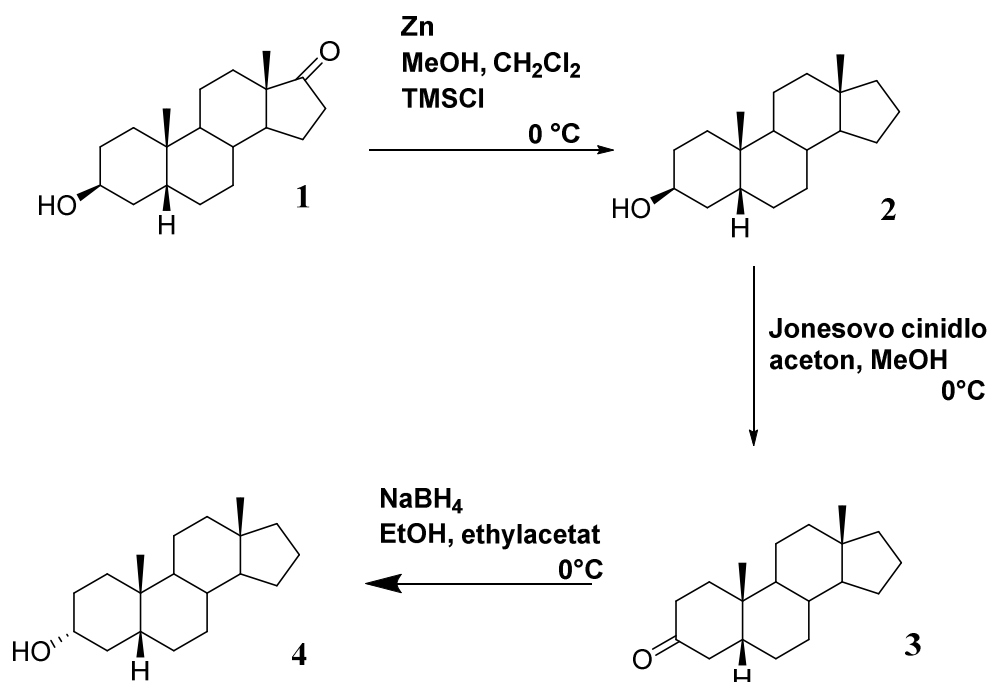
Z literatury¹⁷ je známá inhibice GCPII působením fosfoamidátových derivátů odvozených od glutamové kyseliny. Byly připraveny fosfoamidáty s kovalentně vázanou molekulou cholesterolu, epiandrostanolonu a estronu. Uvedené steroidní konjugáty bohužel neinhibují NMDA receptor. Úkolem předkládané práce bylo syntetizovat analogickou sloučeninu se steroidním substituentem vhodným pro inhibici NMDA receptoru a její vlastnosti porovnat se známými sloučeninami.

3. Syntéza steroidních konjugátů

Při syntéze jsme postupovali metodou popsanou¹⁷ pro výše zmíněné inhibitory, kdy byl steroidní derivát spojen s chráněným benzyloxyfosfinem **7** a po hydrolýze vzniklý, se steroidem **4** konjugovaný fosfit reagoval s chráněnou kyselinou glutamovou nebo glycinem. Odstraněním chránící skupiny jsme získali požadované sloučeniny **11** a **13**.

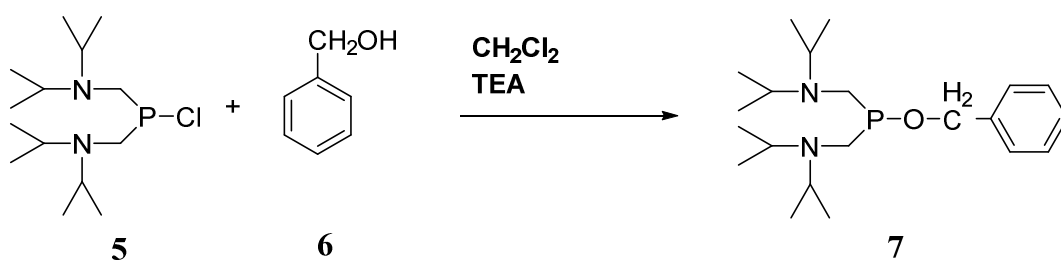
Prvním krokem syntézy byla příprava steroidní části, znázorněná ve schématu 1. Výchozí látkou byl 3 β -hydroxy-5 β -androstan-17-on (**1**). Odstranění karbonylové skupiny, deoxygenace v poloze 17 byla provedena zinkem v metanolu, kdy místo chlorovodíku byl jako kyselina použit trimethylsilylchlorid²⁰. V ¹H-NMR spektru vzniklého derivátu **2** nebyly patrné signály u 2,8 ppm alkylových vodíků v poloze 16 a IČ spektrum nemělo výrazný signál 1707 cm⁻¹ příslušející karbonylové skupině. Potom byla izomerizována β -hydroxylová skupina v poloze 3 na požadovanou α -konfiguraci. Tato skupina je ve steroidech 5 β -řady axiální, proto je výhodnější oxidace a redukce na termodynamicky stabilnější ekvatoriální hydroxyl než izomerizace pomocí SN2 substituce například převedením hydroxylu na tosyl- či mesyl-derivát a jejich zahříváním s dusitanem sodným v dipolárním aprotickém rozpouštědle (dimethylsulfoxidu, případně, dimethylformamidu), nebo izomerizace pomocí Mitsunobovy reakce (reakce hydroxylu s diethylazodikarboxylátem a následně kyselinou mravenčí).

Nejprve byl oxidací Jonesovým činidlem připraven keton **3**. Jeho struktura byla prokázána NMR spektry, v ¹H-NMR spektru vymizel signál geminálního vodíku u hydroxylové skupiny (4,02 ppm), v ¹³C- NMR spektru se objevil signál karbonylové skupiny (213 ppm). Pro redukci 5 β -androstan-3-onu můžeme zvolit stereoselektivní redukční činidla, jako je tri tert butoxy hydridohlinitan lithný nebo tetrahydridoboritan sodný (NaBH₄) spolu s chloridem ceritým (CeCl₃). V našem případě stačilo zvolit vhodné reakční podmínky a použít NaBH₄.



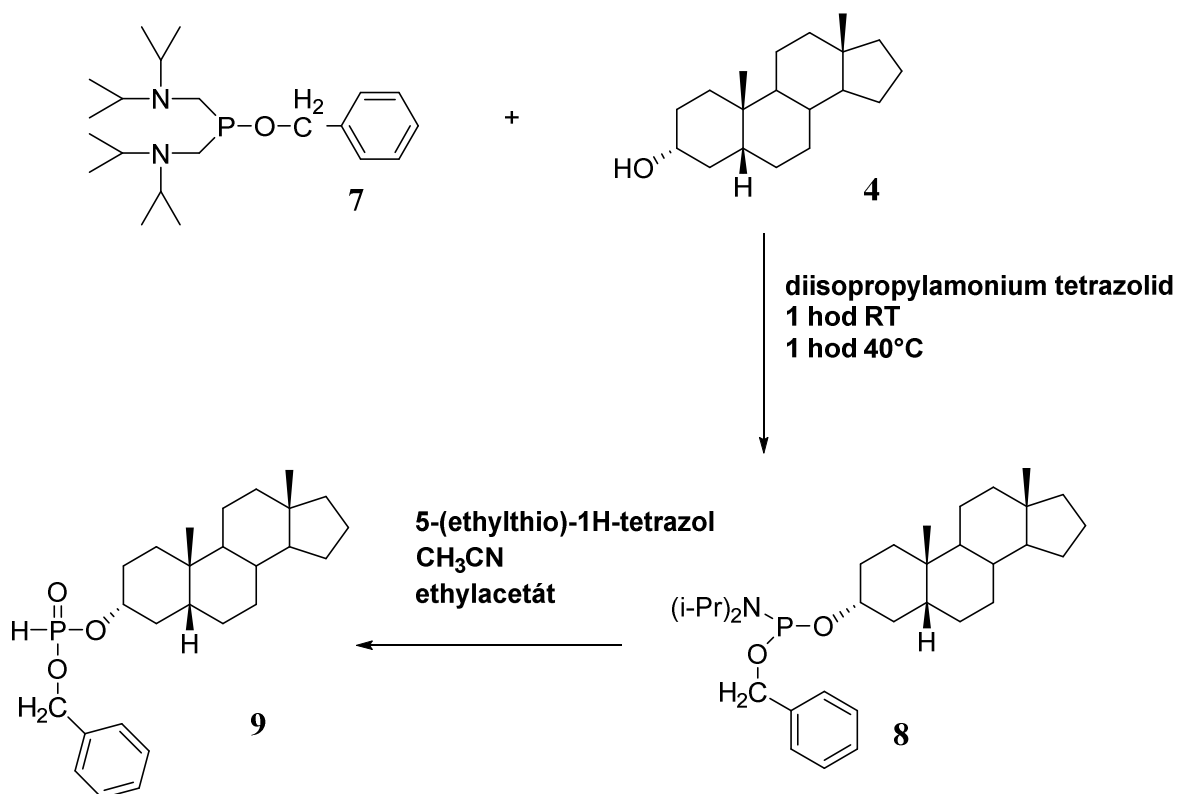
Schema 1

Potom jsme připravili benzyloxyfosfin (7) reakcí bis(diisopropylamino)-chlorofosfinu (5) s benzyloxyalkoholem (6) postupem znázorněným ve schematu 2.



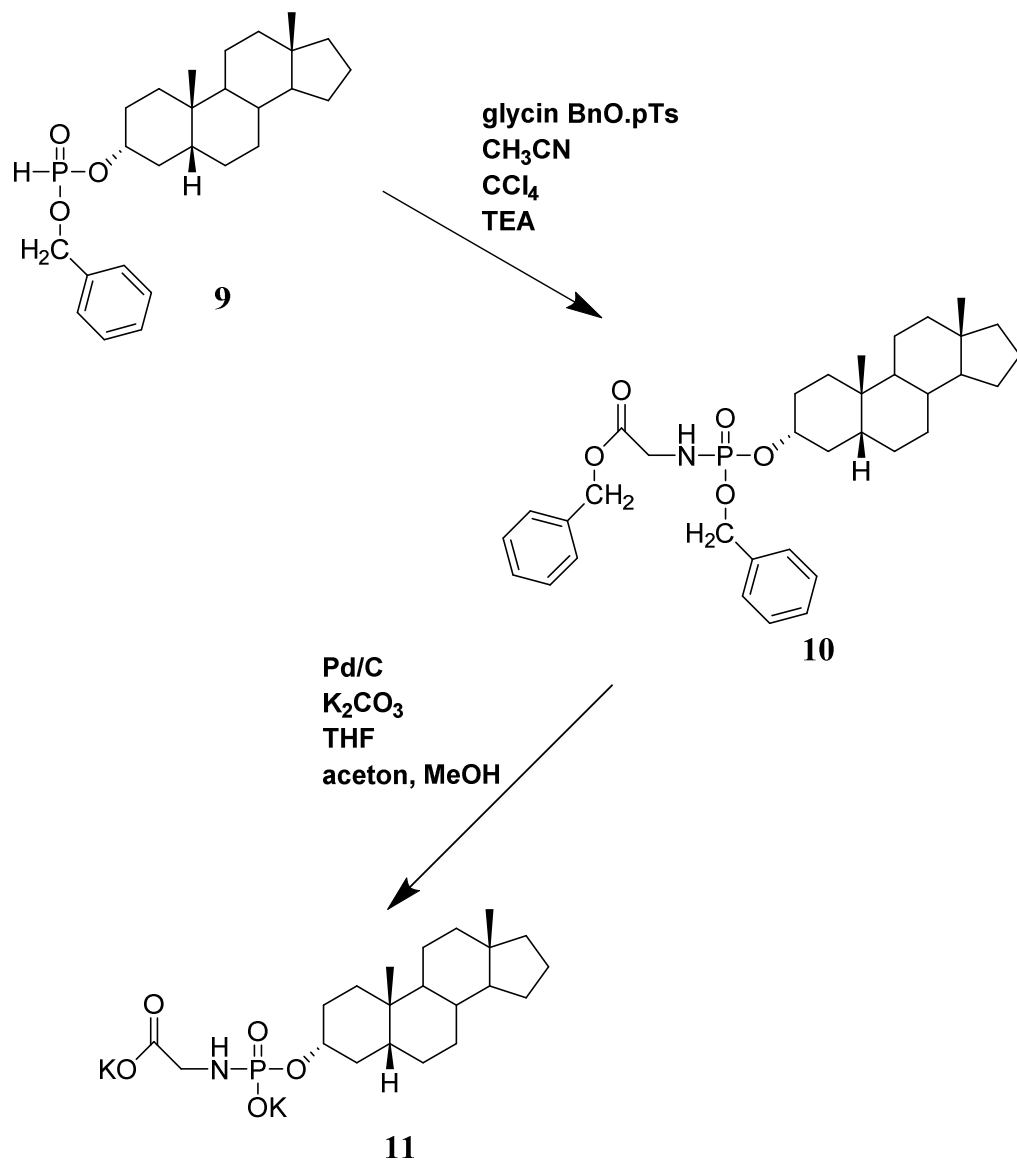
Schema 2

Reakcí benzyloxyfosfinu (**7**) s předem připraveným steroidním alkoholem **4** vznikl chráněný fosfoamidit **8**, jehož hydrolytickým odchráněním vznikl odpovídající steroid-konjugovaný fosfit **9**. Reakce jsou znázorněny na schématu 3.

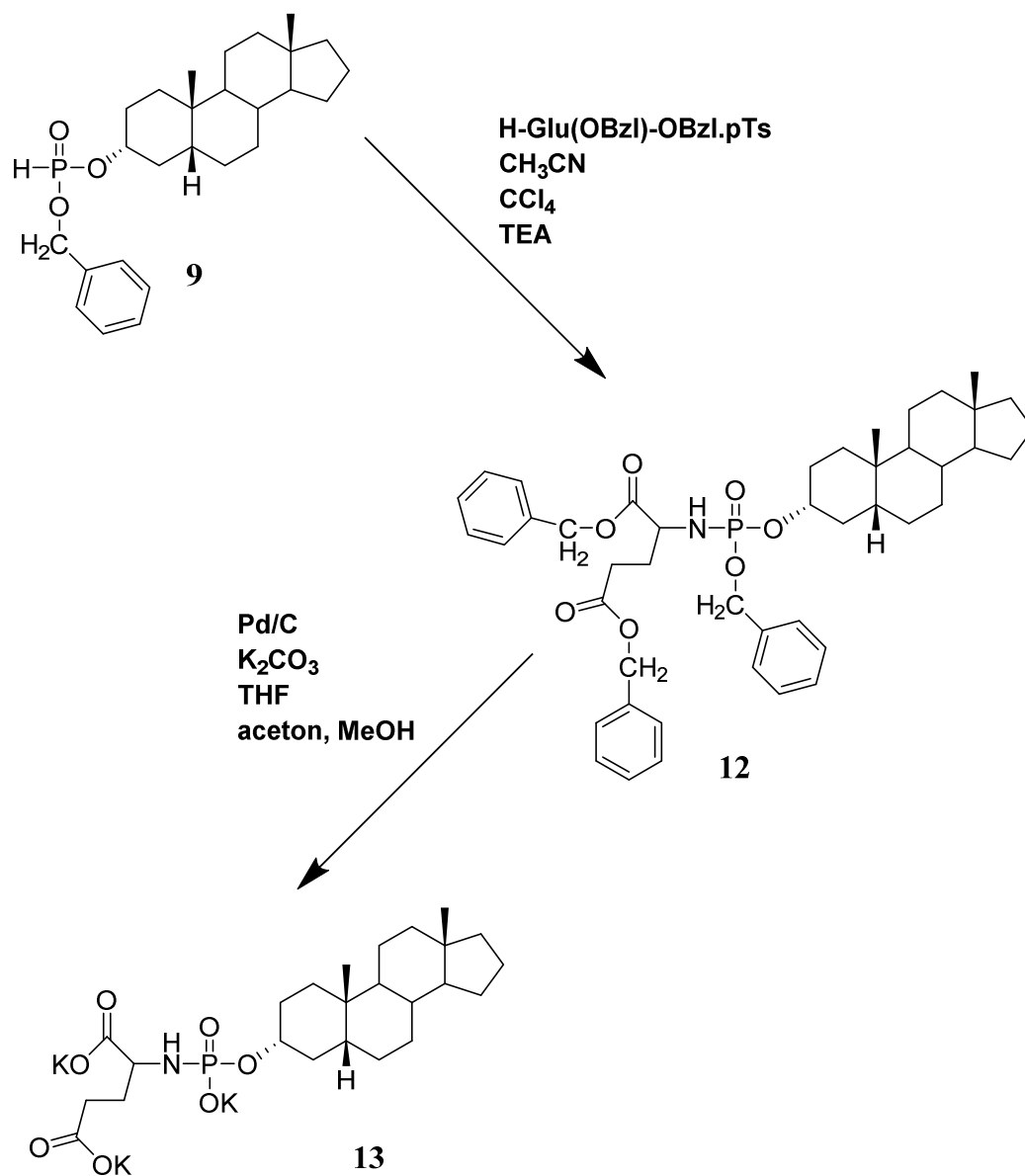


Schema 3

Dalším krokem byla reakce připraveného steroidního derivátu **9** s aminokyselinou, která má karboxylovou skupinu ochráněnou benzylem. Pro tuto práci byly vybrány aminokyseliny glycin a kyselina glutamová. Posledním krokem celé syntézy bylo odstranění chránících benzylových skupin hydrogenací na paladiovém katalyzátoru v alkalickém prostředí uhličitanu draselého (K_2CO_3) za vzniku fosfoamidátu jako draselné soli. Reakce pro obě aminokyseliny jsou znázorněny ve schématech 4 a 5.



Schema 4



Schema 5

4. Výsledky a diskuze

Podářilo se připravit steroidní 3-fosfoamidáty s kyselinou glutamovou a glycinem. Struktura všech meziproductů i konečných productů byla potvrzena fyzikálními měřeními NMR spektry, hmotnostními a infračervenými spektry. Sloučeniny byly charakterizovány teplotami tání, optickou rotací a elementární analýzou.

4.1. Vliv fosfoamidátů na rekombinantní NMDA receptory

Pro elektrofyzilogické stanovení inhibičních vlastností syntetizovaných látek na NMDA receptoru byly použity kultury lidských embryonálních ledvinových buněk (HEK293) transfekované NR1-1a/NR2B/GFP plasmidy podjednotek NMDA receptoru²¹. Metodou patch-clamp byly měřeny proudy indukované agonistou (kyselinou glutamovou) a koagonistou (glycinem) a změny těchto proudů po aplikaci čerstvě připraveného roztoku steroidního fosfoamidátu ve vodném pufru.

Nově syntetizovaný analog **11** má stejný mechanismus působení na NMDA receptoru jako endogenní inhibitor pregnanolon sulfát, liší se však svojí relativní afinitou. Jeho aktivita je nižší. Při použití $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pregnanolonsulfátu byl průměrný inhibiční efekt $67,2 \pm 8,2 \%$ ($n = 5$) na rekombinantních NR1/NR2B receptorech²².

Inhibiční efekt stejné koncentrace fosfoamidátu **11** byl 22 %. Odchylka nebyla vypočtena, protože byla provedena pouze dvě měření, každé za mírně odlišných podmínek. Potíže při stanovení aktivity působila špatná rozpustnost sloučeniny v testovacím pufru. Aktivita fosfoamidátu **13** vůči NMDA receptoru z těchto důvodů nebyla stanovena.

4.2. Inhibiční efekt steroidních fosfoamidátů k GCPII

Inhibiční aktivita byla testována na lidské GCP II s foyl-n- γ -L-glutamovou kyselinou jako substrátem. Uvolněná kyselina glutamová byla stanovena pomocí UPLC. Analyty byly detekovány při 281 nm a 354 nm.

Aktivnější je podle předpokladu derivát **13** ($K_i = 80 \pm 19 \text{ nM}$). Pro glycinový analog je $K_i = 410 \pm 110 \mu\text{M}$. Literatura¹⁷ uvádí pro steroidní analogy hodnotu inhibičních konstant v submikromolárních hodnotách. Jako důležitý strukturní prvek uvádí přítomnost

N-fosfoglutamátového uskupení a relativní toleranci k lipofilní části inhibitoru, v našem případě tvořenou steroidní částí. Naše dosud získané výsledky tomu odpovídají a mohou být základem pro studium dalších podobných látek s předpokládanými lepšími farmakologickými vlastnostmi.

5. Experimentální část

Body tání byly určeny na bodotávku Hund H 600 (Helmut Hund, Německo) a nejsou korigovány. Vzorky pro analýzu byly sušeny nad oxidem fosforečným při 50 °C a tlaku 100 Pa. Optická rotace byla měřena v chloroformu polarimetrem Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders), USA, $[\alpha]_D$ hodnoty jsou uvedeny v $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Infračervená spektra byla měřena v roztocích vzorků v chloroformu nebo v tabletách KBr pomocí spektrometru Bruker IFS 55, vlnočty jsou udány v cm^{-1} . ^1H NMR spektra byla měřena v FT modu při 24 °C a 400 MHz na spektrometru Bruker AVANCE-400 v deuteriochloroformu, s tetramethylsilanem (TMS) jako vnitřním standardem nebo v deuterované vodě. Chemické posuny jsou udány v ppm (δ -stupnice), interakční konstanty (J) a jsou udány v Hz. Multiplicity signálů jsou označeny následovně: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvadruplet, m – multiplet. Všechna spektra byla interpretována jako spektra prvního řádu. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometrech ZAB-EQ (při 70 eV) nebo LCQ Classic (Thermo Finnigan). Při zpracování reakčních směsí byl používán vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (5%), případně nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách pokrytých vrstvičkou silikagelu (ICN Biochemicals). Preparativní tenkovrstvá chromatografie (PLC) byla prováděna na deskách 200 x 200 mm pokrytých 0,7 mm silikagelu (MP Biomedicals). Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Fluka (60 μm). K detekci steroidních látek na TLC deskách byla použita 98% kyselina sírová s následným zahřátím na 300 – 400 °C. Látky na PLC deskách byly vizualizovány 0,5% roztokem morinu v methanolu s následným osvětlením UV zářením (254 nm). Produkty byly izolovány kontinuální extrakcí příslušné chromatografické zóny diethyletherem. Rozpouštědla byla z roztoků odpařována na vakuové odparce (0,25 kPa) při teplotě lázně 40 °C. Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii jsou uvedeny vždy u experimentu. Jonesovo činidlo bylo připraveno smísením CrO_3 (67 g, 0,67 mmol) s roztokem H_2SO_4 (58 ml H_2SO_4 ve 100 ml vody) a směs byla doplněna vodou do 250 ml.

5.1 Příprava fosfoamidátu – reakce s chráněným glycinem

Příprava 5 β -androstan-3 β -olu (2)

Kovový zinek (42 g) byl za stálého míchání postupně přisypáván ke směsi 3 β -hydroxy-5 β -androstan-17-onu (**1**, 6 g, 0,02 mol) v metanolu (90 ml) a dichlormethanu (90 ml). Reakční směs byla ochlazena na 0 °C, byl přikapán TMSCl (84 ml) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 14 hodin. Průběh reakce byl sledován na TLC. Směs byla přefiltrována přes buničinu, filtrát byl neutralizován nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Produkt byl extrahován chloroformem (3 x 50 ml), spojené organické fáze promyty 5% roztokem kyseliny chlorovodíkové (30 ml), nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Produkt byl čištěn chromatografií na silikagelu (4 % acetonu v petroletheru). Bylo izolováno 4,5 g (79 %) 5 β -androstan-3 β -olu (**2**).

Charakterizace:

T.t. 129,5-131°C.

$[\alpha]_D -3,7$ (c 0,27, CHCl₃).

IR (CHCl₃):, 1030 (C-O), 1378, 1448 (CH₃).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,69 (3H, s, H-18), 0,97 (3H, s, H-19), 4,11 (1H, s, H-3).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): 67,39 (C-3), 55,01, 41,20, 40,77, 40,38, 39,41, 37,43, 36,89, 36,31, 35,54, 33,89, 30,32, 28,14, 26,93, 25,75, 24,12, 21,37, 20,80, 17,75.

Pro C₁₉H₃₂O (276,5) vypočteno: 82,55 % C, 11,67 % H; nalezeno: 82,55 % C, 11,57 % H.

MS: ESI m/z 299,3 (100 % M+Na).

HR-MS: ESI m/z pro C₁₉H₃₂ONa [M+Na] vypočteno: 299,2345; nalezeno: 299,2347.

Příprava 5 β -androstan-3-onu (3)

K roztoku 5 β -androstan-3 β -olu (**2**, 7,42 g, 27 mmol) v acetonu (200 ml) bylo přikapáno Jonesovo činidlo (11 ml) při 0 °C a reakční směs byla míchána 5 minut. Průběh reakce byl sledován na TLC. Reakce byla ukončena postupným přidáním metanolu (50 ml) a vody (100 ml). Směs byla zahuštěna na třetinu objemu. Produkt byl extrahován chloroformem (3 x 100 ml), spojené organické fáze byly promyty vodou (3 x 100 ml), vodným nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3 x 100 ml), vodou (3 x 100 ml), sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Produkt

byl čištěn chromatografií na silikagelu (3 % etheru v petroletheru). Bylo izolováno 7,3 g (98 %) 5 β -androstan-3-onu (**3**).

Charakterizace:

T.t. 55-56 °C.

$[\alpha]_D +15,5$ (c 0,26, CHCl₃).

IR (CHCl₃): 1707 (CO), 1385, 1378 (CH₃), 2935, 2865 (CH₂).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,72 (3H, s, H-18), 1,02 (3H, s, H-19), 2,34 (1H, tdd, J = 14,6; 5,4; 0,9 Hz, H-4), 2,77-2,62 (1H, m, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 213,59 (C-3), 54,71, 44,52, 42,55, 41,19, 41,13, 40,59, 39,12, 37,39, 37,30, 36,08, 35,20, 26,80, 26,34, 25,65, 22,85, 21,38, 20,72, 17,67.

Pro C₁₉H₃₀O (274,4) vypočteno: 83,15 % C, 11,02 % H; nalezeno: 83,51 % C, 11,06 % H.

Příprava 5 β -androstan-3 α -olu (4**)**

K vychlazené směsi (0 °C) 5 β -androstan-3-onu (**3**, 2 g, 7,3 mmol) v ethanolu (100 ml) a ethylacetátu (20 ml) byl za míchání přidán tetrahydridoboritan sodný (600 mg, 15,9 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Reakce byla ukončena nalitím reakční směsi do vody a vysrážený produkt byl odsát, promyt vodou a po vysušení čištěn chromatografií na silikagelu (7 % ethylacetátu v petroletheru). Bylo získáno (2,65 g, 88 %) 5 β -androstan-3 α -olu (**4**).

Charakterizace:

T.t. 143-144 °C.

$[\alpha]_D +10,9$ (c 0,27, CHCl₃).

IR (CHCl₃): 3608, 3446 (OH), 1081, 1065, 1034 (CO), 1377, 2972, 2887 (CH₃), 1450, 2935, 2865 (CH₂).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 3,58-3,67 (1H, m, H-3).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 72,05 (C-3), 54,73, 42,28, 41,09, 40,91, 40,64, 39,22, 36,65, 36,38, 35,63, 34,89, 30,73, 27,37, 26,99, 25,70, 23,56, 20,99, 20,74, 17,65.

Pro C₁₉H₃₂O (276,2) vypočteno: 82,55 % C, 11,67 % H; nalezeno: 82,31 % C, 11,82 % H.

Příprava bis(diisopropylamino)-benzyloxyfosfinu (7)

K roztoku bis(diisopropylamino)-chlorofosfinu (**5**, 1,6 g, 6 mmol) v absolutním dichlormethanu (10 ml) byl přikapán triethylamin (836 μ l, 6 mmol) a absolutní benzylalkohol (**6**, 620 μ l, 6 mmol) při 0 °C a pod inertní atmosférou. Reakční směs byla míchána po dobu 10 minut a vzniklý roztok bis(diisopropylamino)-benzyloxyfosfinu (**7**) byl bez zpracování použit do další reakce.

Příprava benzyl (3 α ,5 β -androstan-3-yl) fosfonátu (9)

K připravenému bis(diisopropylamino)-benzyloxyfosfinu (**7**) v dichlormethanu byla přidána směs diisopropylammonium tetrazolidu (358 mg, 2 mmol) a steroidního alkoholu (**4**, 548 mg, 1,98 mmol) a vzniklá směs byla míchána pod inertní atmosférou 1 hod za laboratorní teploty a poté 1 hod při 40 °C. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a k odparku diisopropylfosfoamiditu **8** byl přidán acetonitril (30 ml) a přikapán roztok 5-(ethylthio)-1H-tetrazolu (286 mg, 2 mmol) ve vodě (2 ml) a acetonitrilu (2 ml). Tato reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Produkt byl extrahován ethylacetátem (100 ml), spojené organické fáze byly promyty vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (5%, 3 x 100 ml), vodným nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3 x 100 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny síranem hořečnatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Produkt byl čištěn chromatografií na silikagelu (7 % ethylacetátu v petroletheru). Bylo získáno (461 mg, 54 %) fosfonátu.

Příprava benzyl (benzyloxy) ((3 α ,5 β -androstan-3-yl) oxy) fosforyl-glycinátu (10)

Směs fosfonátu **9** v acetonitrilu (2,5 ml) a tetrachlormethanu (7,5 ml) byla přikapána do roztoku chráněného glycinu (712 mg, 4,3 mmol) v triethylaminu (720 μ l, 2,6 mmol). Po 2,5 hodinách míchání za laboratorní teploty pod inertní atmosférou, byl produkt extrahován ethylacetátem (2 x 50 ml), spojené organické fáze byly postupně promyty vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (5%, 3 x 50 ml), vodným nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3 x 50 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny síranem hořečnatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Surový produkt byl čištěn chromatografií na silikagelu (15 % acetonu v petroletheru) a byl izolován glycinát **10** (308 mg, 52 %).

Příprava ((3 α ,5 β -androstan-3-yl) oxy) oxidofosforyl-glycinátu draselného (11)

Směs látky **10** (308 mg, 0,5 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml), Pd/C (10 %, 10 mg) a uhličitanu draselného (1,14 g, 8,2 mmol) byla hydrogenována za mírného přetlaku vodíkem 4 hodiny. Poté byla směs přefiltrována přes krátký sloupeček buničiny a několikrát promyta metanolem. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Bylo izolováno 201 mg (79 %) glycinátu **11**, který byl krystalizován z destilované vody.

Charakterizace:

$[\alpha]_D + 9,5$ (c 0,25, H₂O).

IR (KBr): 1588, 1396 (CO₂⁻), 3274 (NH), 1204, 1077, 1062 (PO₂⁻), 1037 (P-O-C), 1377, 1450 (CH₃).

¹H NMR (400 MHz, D₂O + dioxan): δ 0,67 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 3,38 (2H, d, J, 7,3, H-C2'), 4,02 (1H, m, H-3).

¹³C NMR (126 MHz, D₂O + dioxan): 179,16 (C-O), 76,31 (C-3), 62,62, 54,14, 45,27, 41,98, 40,54, 40,47, 40,23, 38,71, 36,04, 35,07, 34,24, 28,62, 26,92, 26,58, 25,32, 22,84, 20,59, 20,27, 16,95.

Pro C₂₁H₃₄K₂NO₅P (489,14) vypočteno: 51,51 % C, 7,00 % H, 2,86 % N, nalezeno: 37,72 % C, 5,46 % H 1,76 % N.

MS: ESI m/z 528,1 (100 % M+K), 490,1 (17 % M+1).

HR-MS: ESI m/z pro C₂₁H₃₅K₂NO₅P [M+1] vypočteno: 490,1522; nalezeno: 490,1522.

5.2 Příprava fosfoamidátu - reakce s chráněnou kyselinou glutamovou

Příprava dibenzyl (benzyloxy) ((3 α ,5 β -androstan-3-yl) oxy) fosforyl-glutamátu (12)

Směs fosfoamidátu **9** v acetonitrilu (1,6 ml) a tetrachlormethanu (4,7 ml) byla přikapána do roztoku chráněné kyseliny glutamové (447 mg, 0,9 mmol) v triethylaminu (452 μ l, 3,3 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty pod inertní atmosférou po dobu 2,5 hodiny. Produkt byl extrahován ethylacetátem (2 x 20 ml). Spojené organické fáze byly postupně promyty vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (5%, 3 x 40 ml), vodným nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3 x 40 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny síranem hořečnatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Surový produkt byl čištěn chromatografií na silikagelu (15 % acetonu v petroletheru) a byla izolována látka **12** (301 mg, 33 %).

Příprava ((3 α ,5 β -androstan-3-yl) oxy) oxidofosforyl-glutamátu draselného (13)

Směs látky **12** (301 mg, 0,4 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml), Pd/C (10%, 7,9 mg) a uhličitanu draselného (0,9 g, 6,5 mmol) byla hydrogenována za mírného přetlaku vodíkem 4 hodiny. Poté byla směs přefiltrována přes krátký sloupeček buničiny a několikrát promyta metanolem. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Glutamát (**13**) byl následně krystalizován z destilované vody. Bylo získáno 100 mg (41,6 %) glutamátu **13**.

Charakterizace:

$[\alpha]_D +11,4$ (c 0,27, H₂O).

IR (KBr): 3271 (OH), 3420 (NH), 1589, 1402 (CO₂⁻) 2963, 2866 (CH₂).

¹H NMR (400 MHz, D₂O + dioxan): δ 0,46 (1H, s, H-18), 0,70 (1H, s, H-19), 2,04-1,90 (2H, m, H-C4'), 3,31-3,27 (1H, m, H-C2'), 3,77-3,71 (1H, m, H-3).

¹³C NMR (126 MHz, D₂O + dioxan): δ 183,20, 181,39, 76,27, 64,00, 56,63, 54,11, 42,01, 40,52, 40,22, 38,69, 36,03, 35,10, 34,35, 34,22, 33,71, 32,29, 28,65, 26,93, 26,59, 25,30, 22,83, 20,57, 20,25, 16,91.

Pro C₂₄H₃₇O₇NK₃P (599,83) vypočteno: 48,06 % C, 6,22 % H, 2,34 % N; nalezeno: 38,77 % C, 5,49 % H, 1,16 % N.

MS: ESI m/z 638,3 (100 %, M+K), 600,4 (26 %, M+1).

HR-MS: ESI m/z pro C₂₄H₃₈O₇NK₃P [M+1] vypočteno: 600, 1292; nalezeno: 600, 1294.

6. Seznam použité literatury

1. Moss G. P.: Nomenclature of steroids (Recomendation 1989) *Pure Appl Chem*, **1989**, 61, 1783.
2. Černý V., Fajkoš E., Heřmánek S., Janata V., Protiva M., Schwarz V., Syhora K., Sýkora V., Šantavý F., Vystrčil A.: *Chemie steroidních sloučenin*, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha **1960**, 49-57.
3. Kasal A.: *Chemie a biochemie přírodních látek, kap. 3: Steroidy na začátku jednadvacátého století*, učební text ÚOCHB, Praha **2002**, 79-94.
4. Reinitzer F.R.: Beiträge zur Kenntniss des Cholesterins. *Monatshefte für chemie*, **1888**, 421-441.
5. Benjamins J.A., Murphy E.J., Seyfried T.N.: *Basic Neurochemistry, chapter 5: Lipids*. **2012**, 81-85.
6. Dorda M., Vlček K., Chodounská H., Vyklický L. Jr.: Neurosteroidy – mechanismus působení a možnosti užití v klinické praxi. *Psychiatrie*, **2001**, *Supplementum 3*, 5.
7. Baulieu E.-E.: Neurosteroid: a new function in the brain. *Biol Cell*, **1991**, 71, 3-10.
8. Cais O., Vyklický L.: Molekulární a systémové účinky neurosteroidů. *Psychiatrie*, **2006**, *Supplementum 3*, 10, 8-11.
9. Kořínek M., Kapras V., Vyklický V., Adamusová E., Borovská J., Valeš K., Stuchlík A., Horák M., Chodounská H., Vyklický Jr. L.: Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: Molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids*, **2011**, 76, 1409-1418.
10. Hons J.: Nové možnosti farmakologického ovlivnění glutamátergního systému u schizofrenie. *Psychiatrie*, **2006**, 2, 85-90.
11. Šťastná E: Kandidátská disertační práce PŘF UK Praha, Katedra jaderné a organické chemie, **2009**, 10-18.
12. Obrázek č.7 byl převzat z <http://www.chrisparsons.de/Chris/images/NMDA.jpg>, 23. 4. 2014.
13. Valeš K., Rambousek L., Stuchlík A., Chodounská H., Vyklický L.: Srovnání vlivu systémové aplikace non-kompetitivních a use-dependentních NMDA antagonistů na lokomoční aktivitu a kognitivní funkce u laboratorního potkana. *Psychiatrie*, **2010**, *Supplementum 2*, 14, 26-29.

14. Wang M., He Y., Eisenman L., Fields C., Mathews J., Benz A., Fu T., Zorumski E., Steinbach J., Mennerick S.: 3beta-hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA_A receptor antagonists. *J Neurosci*, **2002**, 22,3366-3375.
15. Wu L., Gibbs T., Farb D.: Pregnenolone sulfate a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol*, **1991**, 40, 333-336.
16. Park-Chung M., Malayev A., Purdy R., Gibbs T., Farb D.: Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acid A receptor function through distinct sites. *Brain Res*, **1999**, 830, 72-87.
17. Wu L.I., Do J.C., Kazak M., Page H., Toriyabe Y., Anderson M.O., Berkman C.E.: Phosphoramidate derivatives of hydroxysteroids as inhibitors of prostate-specific membrane antigen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 281-284.
18. Vik V., Šácha P., Koukolík F., Konvalinka J., Pacík D., Zchoval R.: Co nového víme o PSMA (prostatický specifický membránový antigen z pohledu urologa). *Urol List*, **2007**, 5(4), 10-13 .
19. Šácha P., Zámečník J., Bařinka C., Hlouchová K., Vícha A., Mlčochová P., Hilgert I., Eckschlagler T., Konvalinka J.: Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain. *Neuroscience*, **2007**, 4 (144), 1361-1372.
20. Xu S., Toyama T., Nakamura J., Arimoto H.: One-pot reductive cleavage of exo-olefin to methylene with a mild ozonolysis Clemmensen reduction sequence. *Tetrahedron Letters* 51, **2010**, 4534-4537.
21. Cais O., Sedláček M., Horák J., Dittert I., Vyklický L.Jr: Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptors channels. *Neuroscience*, **2008**, 151(2), 428-438.
22. Petrovič M., Sedláček M., Horák M., Chodounská H., Vyklický L. Jr.: 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *Neuroscience*, **2005**, 25(37), 8439-50.