

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

ΠΑΝΤΖΟΥ Α. ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σχεδιασμός και σύνθεση νέων νευροστεροειδών με αντιπολλαπλασιαστική

και νευροπροστατευτική δράση

ΑΘΑΝΑΣΙΑ Α. ΠΑΝΤΖΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΤΣΟΤΙΝΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

ΔΡ. ΘΕΟΔΩΡΑ ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΥ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΕΡΕΥΝΩΝ Ε.Ι.Ε.

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Β. ΦΩΣΚΟΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΣΟΤΙΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Β. ΦΩΣΚΟΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΣΟΤΙΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΔΡ. ΘΕΟΔΩΡΑ ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΥ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΕΡΕΥΝΩΝ Ε.Ι.Ε.

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΦΥΤΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΜΙΚΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΠΟΥΛΗ ΝΙΚΟΛΑΪΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΚΟΛΟΚΟΥΡΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 26/10/2011

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, σχεδιάσθηκαν και συντέθηκαν νέα ανάλογα της πρεγνενολόνης (PREG) και της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) με στόχο την αποτίμηση της βιολογικής δράσης σε διάφορα συστήματα.

Ειδικότερα για τα ανάλογα της πρεγνενολόνης, ο σχεδιασμός τους βασίσθηκε σε πρόσφατες αναφορές στη βιβλιογραφία για την αντικαρκινική δράση παρόμοιων ενώσεων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι ενώσεις είναι τροποποιημένες στο Δ δακτύλιο του στεροειδικού συστήματος, όπου εισήχθησαν διάφορες αρυλοαλκυνυλομάδες. Η δράση των νέων στεροειδών που προέκυψαν αξιολογήθηκε σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και τα βιολογικά αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, δεδομένου ότι τα ανάλογα αυτά επέδειξαν σημαντικές αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες.

Όσον αφορά στα ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA), ο σχεδιασμός τους στηρίχθηκε στη νευροπροστατευτική δράση αυτού του ενδογενούς στεροειδούς. Αναλυτικότερα, συντέθηκαν 2 σειρές 17-σπειροκυκλικών αναλόγων: η μεν πρώτη σειρά περιλαμβάνει στεροειδή που φέρουν υποκατεστημένο ή μη εποξειδικό δακτύλιο στη θέση 17, καθώς και κυκλοπροπανικό δακτύλιο στην ίδια θέση, ενώ η δεύτερη σειρά περιλαμβάνει στεροειδή που φέρουν υποκατεστημένους ή μη σπειρο-πυρανικούς και φουρανικούς δακτυλίους στον C17. Τα 17-σπειρο-εποξείδια εμφάνισαν αξιόλογη αντι-αποπτωτική δράση σε νευρικά κύτταρα η οποία δε συνοδεύεται από ορμονικές παρενέργειες, ενώ *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έναντι της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας επιβεβαίωσαν τη νευροπροστατευτική τους επίδραση. Για τα 17-εποξυ-σπειροκυκλικά στεροειδή πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική ανάλυση και έγινε μοριακή μοντελοποίηση αυτών, προκειμένου να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων.

Τέλος, οι ενδείξεις για αλληλεπίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης με υποδοχείς του νευροαυξητικού παράγοντα (NGF) αποτέλεσαν το έναυσμα για τη σύνθεση αναλόγου της δεϋδροεπιανδροστερόνης το οποίο προσδέθηκε ομοιοποπολικά στη NovaPEG αμινο-ρητίνη. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης κατέδειξαν ότι το ακινητοποιημένο παράγωγο καταβυθίζει τους συγκεκριμένους υποδοχείς. Με αυτόν τον τρόπο, επιβεβαιώθηκε ο άμεσος συσχετισμός των νευροτροφικών ιδιοτήτων της δεϋδροεπιανδροστερόνης και του νευροαυξητικού παράγοντα και αποσαφηνίσθηκε εν μέρει ο μηχανισμός της αντι-αποπτωτικής δράσης του ανωτέρω νευροστεροειδούς.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Σύνθεση νευροστεροειδών

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Νευροστεροειδή, αντιπολλαπλασιαστική δράση, νευροπροστασία, απόπτωση, νευροεκφυλιστικές νόσοι

ABSTRACT

The present thesis involves the design and synthesis of new pregnenolone (PREG) and dehydroepiandrosterone (DHEA) analogues with the aim to evaluate their biological properties.

Especially for the pregnanolone analogues, their design was based on recent bibliographic data concering the anticancer activity of similar derivatives. In our case, the compounds bear modifications on the D ring of the steroid backbone, where several arylalkynyl groups were introduced. The activity of these novel steroids was evaluated against a series of cancer cell lines and the compounds exhibited significant antiproliferative activities.

As for the dehydroepiandrosterone analogues, their design was based on the neuroprotective properties of this endogenous steroid. In detail, we synthesized 2 series of 17-spirocyclic derivatives: the first includes steroids which bear a spiro-epoxide ring (substituted or not) at position 17 or a substituted spiro-cyclopropyl ring at the same position, whereas the second series comprises steroids with spiro-pyrane or furane rings at C17. The 17-spiro-epoxides protected neurons from apoptosis significantly without exhibiting endocrine side effects, while their neuroprotective activity was confirmed by *in vivo* experiments in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Moreover, the correlation of the *in vitro* results with the active conformations of the above mentioned compounds was achieved by a combination of minimization algorithms with stochastic and systematic conformational analysis.

Finally, based on our preliminary results concerning a possible interaction of dehydroepiandrosterone with receptors of nerve growth factor (NGF) we synthesized a dehydroepiandrosterone analogue which was covalently attached to NovaPEG amino-resin. Immunoprecipitation experiments revealed that the immobilized DHEA pulls down the receptors of nerve growth factor, thus indicating that dehydroepiandrosterone exerts its neurotrophic properties by directly interacting with NGF.

SUBJECT AREA: Synthesis of neurosteroids

KEYWORDS: Neurosteroids, antiproliferative activity, neuroprotection, apoptosis, neurodegenerative diseases

<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u>

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου, Διευθύντριας Ερευνών.

Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Θ. Καλογεροπούλου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργασθώ στην ομάδα της, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις τις οποίες μου προσέφερε τόσο κατά την εργασία στο εργαστήριο, όσο και σε θεωρητικό επίπεδο χημείας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγήτη κ. Γεώργιο Φώσκολο και Καθηγητή κ. Ανδρέα Τσοτίνη για τις πολύτιμες οδηγίες και υποδείξεις τους κατά τη διάρκεια συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να αποδώσω θερμές ευχαριστίες στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Γ. Φυτά, Καθηγητή κ. Ε. Μικρό, Αναπληρώτρια κ. Ν. Πουλή και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Α. Κολοκούρη για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια Ερευνών Δρ. Μ. Κουφάκη και το Διευθυντή Ερευνών Δρ. Δ. Παπαχατζή, οι οποίοι με την εμπειρία τους και τις γνώσεις τους βοήθησαν σημαντικά το εργαστηριακό μου έργο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αρμόζουν στον Καθηγητή Α. Γραβάνη, το Λέκτορα Ι. Χαραλαμπόπουλο, το Δρ. Β. Μηνά και τους Β. Βέργου και Ι. Λαζαρίδη από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, το Διευθυντή Ερευνών Δρ. Μ. Αλέξη, τη Δρ. Ξανθίππη Αλέξη και τη Δρ. Ε. Κατσάνου από το Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας για τα βιολογικά και φαρμακολογικά πειράματα των ενώσεων οι οποίες συντέθηκαν σε αυτή την εργασία, καθώς και στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π. Παπαζαφείρη από το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη διεξαγωγή των αντικαρκινικών πειραμάτων και την Ερευνήτρια Β' Δρ. Β. Πανουτσακοπούλου από το Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. για τη διεξαγωγή της *in vivo* μελέτης. Επίσης, από το Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών θα ήθελα να ευχαριστήσω διαμορφωτική ανάλυση των ενώσεων που συντέθηκαν, αλλά και τους Ελένη Σιάπη και Δρ. Florian Pitterl για τα φάσματα μάζας των παραγώγων αυτών.

Όσον αφορά στο προσωπικό του εργαστηρίου, θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεργασία τους τις παρασκευάστριες κ. Σ. Κοψιδά και Α. Νάκου, αλλά και τις γραμματείς του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας κ. Μ. και Φ. Καλατζή.

Πολλά και θερμά ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά τους στο εργαστήριο, αλλα και το ευχάριστο κλίμα μέσα στο οποίο μου επέτρεψαν να δουλέψω οφείλω στους συναδέλφους Δρ. Ν. Αυλωνίτη, Δρ. Ε. Κοΐνη, Δρ. Κ. Γεωργικοπούλου, Δρ. Γ. Ναξάκη, Δρ. Ε. Θεοδώρου, Δρ. Β. Ναχμία, Δρ. Χ. Κιζιρίδη, αλλά και στους αλλοδαπούς συνεργάτες και πολύ καλούς φίλους G. Szalóki, Η. Guerrand και Α. Blanrue. Τον τελευταίο καιρό ήταν πολύ θετική η παρουσία στο εργαστήριο των φίλων Δρ. Κ. Προυσή, Δρ. Κ. Μπασκάκη, Δρ. Π. Καλούδη, των υποψήφιων διδάκτορων Θ. Φωτοπούλου, Α. Τσατσαρώνη και Μ. Τσάκου, καθώς επίσης της Λ. Καλοπετρίδου και Μ. Schimpgen, των οποίων η συνεργασία, η συμπαράσταση και η φιλία ήταν καθοριστική.

Ωστόσο, το μεγαλύτερο ευχαριστώ αξίζει στους δικούς μου ανθρώπους, τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου και την οικογένεια μου. Οι μεν πρώτοι με στήριξαν και με πίστεψαν από την αρχή μέχρι το τέλος, η δε οικογένειά μου ύπηρξε ανεκτίμητος αρωγός και στυλοβάτης όλων των προσπαθειών μου και αψήφησε οποιεσδήποτε θυσίες και κόπους για να με βοηθήσει να επιτύχω τους στόχους μου. Είναι πέρα από βέβαιο ότι ιδίως χωρίς την οικογένειά μου δε θα είχα φτάσει μέχρι εδώ ούτε θα ήμουν σήμερα ο άνθρωπος που είμαι. Είμαι σίγουρη ότι ακόμα και αυτές οι λέξεις δεν είναι καθόλου αρκετές για να εκφράσουν την αμέριστη ευγνωμοσύνη και αγάπη μου.

Στην οικογένειά μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</u>
<u>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:</u> ΕΙΣΑΓΩΓΗ
1.1 Γενικά
1.2 Νευροστεροειδή
1.3 Ένζυμα στεροειδογένεσης
1.4 Βιοσύνθεση των νευροστεροειδών
1.5 Εγκεφαλικά κύτταρα σύνθεσης των νευροστεροειδών
1.6 Μηχανισμός δράσης των νευροστεροειδών40
1.7 Υποδοχείς GABA _A
1.7.1 Γενικά
1.7.2 Δομή των υποδοχέων GABA _A
1.7.3 Λειτουργία και φαρμακολογία των υποδοχέων GABA _A
1.7.4 Συσχέτιση φαρμακολογικών ιδιοτήτων των υποδοχέων GABA _A με τη σύσταση
των υπομονάδων τους
1.7.5 Φωσφορυλίωση
1.7.6 Ρύθμιση των υποδοχέων GABA _A από τα νευροστεροειδή
1.7.6.1 Συναπτικοί υποδοχείς GABA _A 57
1.7.6.2 Εξωσυναπτικοί υποδοχείς GABA _A
1.7.7 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των νευροστεροειδών με τους υποδοχείς GABA _A 60
1.7.8 Σχέση δομής-δραστικότητας στεροειδών ρυθμιστών των υποδοχέων GABA _A 63
1.8 Υποδοχείς NMDA
1.9 Υποδοχείς σ
1.10 Υποδοχείς 5-HT ₃
1.11 Υποδοχείς γλυκίνης
1.12 Φυσιολογικός ρόλος των νευροστεροειδών70
1.12.1 Οξύ και χρόνιο στρες
1.12.2 Αγχολυτική δράση
1.12.3 Μνήμη
1.12.4 Σπασμολυτικές ιδιότητες
1.12.5 Αντιψυχωσική δράση

1.12.6 Αντικαταθλιπτική δράση	75
1.12.7 Προεμμηνορροϊκή δυσφορία (PDD) και κατάθλιψη μετά τον τοκετό (PND)	75
1.12.8 Μυελίνωση	76
1.12.9 Οργανογένεση-Νευρογένεση	78
1.12.10 Διαφοροποίηση ολιγοδενδροκυττάρων	82
1.13 Κυτταρικός θάνατος	83
1.13.1 Νέκρωση	83
1.13.2 Απόπτωση	84
1.13.3 Απόπτωση νευρώνων-Μηχανισμοί νευροεκφύλισης	87
1.13.3.1 Κασπάσες	89
1.13.3.2 Παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικής πρωτεάσης Apaf1	90
1.13.3.3 Πρωτεΐνες Bcl-2	90
1.13.3.4 Αποπτωτικά μονοπάτια	91
1.14 Οξειδωτικό στρες	96
1.15 Νευροπροστασία	97
<u>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:</u> ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΡΥΛΑΛΚΥΝΥΛΟΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ	
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160 165
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160 165 166
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160 165 166
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160 165 166 166
ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ	100 111 154 160 160 165 166 166

5.2.3 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην έκφραση των	
αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στα κύτταρα PC12	. 173
5.2.4 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην έκκριση και	
παραγωγή ντοπαμίνης στα κύτταρα PC12	. 174
5.2.5 Αποτίμηση της ορμονικής δράσης και της επίδρασης των 17-σπειροκυκλικών	
αναλόγων 6, 9 και 13 στη ρύθμιση της έκφρασης των εξαρτώμενων από τους	
υποδοχείς οιστρογόνων γονιδίων αναφοράς	. 176
5.2.6 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην ανάπτυξη	
καρκινικών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από ενδοκρινο-εξαρτώμενους	
όγκους	. 180
5.2.7 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην κυτταρική	
βιωσιμότητα των κυττάρων PC12, HEK293 και HT22	. 182
5.2.8 Αποτίμηση της δράσης των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 έναντι	
της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας	. 184
5.2.9 Νευροπροστατευτική δράση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 18, 23 και 28	
στα κύτταρα PC12	. 188
5.2.10 Συμπεράσματα	. 190
5.3 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με την ακινητοποιημένη σε πολυμερές 7(<i>Ζ</i>)-(Ο-	
καρβοξυμεθυλ)οξίμη της 3 <i>8</i> -υδροξυ-ανδροστ-5-εν-7,17-διόνης	. 192
5.3.1 Αλληλεπίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης με τους μεμβρανικούς	
υποδοχείς του νευροαυξητικού παράγοντα	. 192
5.3.2 Συμπεράσματα	. 194
<u>6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:</u> ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ	
17-ΕΠΟΞΥ-ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΔΕΫΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	. 196
6.1 Γενικές μέθοδοι	196
6.2 Διαμορφωτική ανάλυση	197
6.3 Υπέρθεση των ενώσεων 6, 9, 13 και της δεϋδροεπιανδροστερόνης	201
6.4 Συμπεράσματα	203
<u>7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:</u> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	. 205
7.1 Όργανα και διατάξεις	205
7.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	206
7.3 Αντιδραστήρια και διαλύτες	206

7.4 Μέθοδοι	207
<u>8. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</u>	266
<u>9. ПАРАРТНМА I</u>	267
<u>10. ПАРАРТНМА II</u>	272
<u>11. ПАРАРТНМА III</u>	276
<u>12. ВІВЛІОГРАФІА</u>	278

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<u>Σχήμα 1.1:</u> Γενική δομή στεροειδών και η αρίθμησή τους
<u>Σχήμα 1.2:</u> Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής του ανθρώπινου κυτοχρωμικού P450
ισοένζυμου 2C9 με την ομάδα της αίμης να είναι ορατή στο κέντρο
<u>Σχήμα 1.3:</u> Η έκφραση των νευροστεροειδογενετικών ενζύμων στο νευρικό σύστημα
(Α) των ενηλίκων και (Β) των εμβρύων33
<u>Σχήμα 1.4:</u> Βιοσύνθεση των νευροστεροειδών στο νευρικό σύστημα και
νευροστεροειδογενετικά ένζυμα τα οποία συμμετέχουν σε αυτή
<u>Σχήμα 1.5:</u> Γλοιακά κύτταρα εγκεφάλου
<u>Σχήμα 1.6:</u> Νευρώνες Purkinje
<u>Σχήμα 1.7:</u> Μη γονιδιακές και γονιδιακές δράσεις των νευροστεροειδών
<u>Σχήμα 1.8:</u> Παραγωγή, απελευθέρωση, δράση και αποικοδόμηση του <i>γ</i> -
αμινοβουτυρικού οξέος σε μια τυπική GABAεργική σύναψη
<u>Σχήμα 1.9:</u> Δομή του υποδοχέα GABA _A 49
<u>Σχήμα 1.10:</u> Θέσεις αλληλεπίδρασης του υποδοχέα GABA _A με το γ-αμινοβουτυρικό
οξύ και τους διάφορους τροποποιητές της δράσης του52
<u>Σχήμα 1.11:</u> Σύσταση υπομονάδων σε συναπτικούς και εξωσυναπτικούς υποδοχείς
GABA _A στα πυραμιδικά κύτταρα CA154
<u>Σχήμα 1.12:</u> Ο υποδοχέας GABA _A και φάρμακα με τα οποία αλληλεπιδρά
<u>Σχήμα 1.13:</u> Ρύθμιση της ανασταλτικής νευροδιαβίβασης από τα νευροστεροειδή 60
<u>Σχήμα 1.14:</u> Δομή των υποδοχέων NMDA και θέσεις αλληλεπίδρασης με αγωνιστές
και ανταγωνιστές τους65
<u>Σχήμα 1.15:</u> Απεικόνιση της δομής των σ υποδοχέων67
<u>Σχήμα 1.16:</u> Απεικόνιση της δομής των υποδοχέων 5-ΗΤ₃
<u>Σχήμα 1.17:</u> Μοντέλο της εξωκυττάριας δομικής περιοχής των υποδοχέων γλυκίνης 69
<u>Σχήμα 1.18:</u> Δομή του συνθετικού αναισθητικού νευροστεροειδούς αλφαξολόνη
<u>Σχήμα 1.19:</u> Δομή ενός τυπικού νευρώνα επικαλυμμένου με μυελίνη
<u>Σχήμα 1.20:</u> Φωτογραφία εμμύελων νευρικών ινών η οποία έχει ληφθεί μέσω
σαρωτικής ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας78
<u>Σχήμα 1.21:</u> Πρώτα στάδια της νευρογένεσης

<u>Σχήμα 1.22:</u> Υποθετικό μοντέλο για την αντιαποπτωτική επίδραση του συνδυασμού
της δεϋδροεπιανδροστερόνης και του νευροαυξητικού παράγοντα στους νευρώνες 81
<u>Σχήμα 1.23: </u> Απεικόνιση των διαδοχικών φάσεων της διαφοροποίησης των
ολιγοδενδροκυττάρων από τις πρόδρομες μορφές τους και μοριακοί δείκτες οι
οποίοι συμμετέχουν σε αυτή τη μορφολογική αλλαγή
<u>Σχήμα 1.24:</u> Απεικόνιση της φαγοκύττωσης, όπου τα αποπτωτικά σώματα του
"θανόντος" κυττάρου απορροφώνται από τα μακροφάγα κύτταρα
<u>Σχήμα 1.25:</u> Μονοπάτια απόπτωσης 88
<u>Σχήμα 1.26:</u> Ενεργοποίηση των κασπασών
<u>Σχήμα 1.27:</u> Απεικόνιση του τρόπου δράσης του υποδοχέα Fas
<u>Σχήμα 1.28</u> : Απεικόνιση του ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού της
απόπτωσης95
<u>Σχήμα 2.1:</u> Γενική δομή (Α) 21-τριαζολυλοπαραγώγων της πρεγνενολόνης και (Β) 17-
πυραζολινυλοπαραγώγων της ανδροστενόλης101
<u>Σχήμα 2.2:</u> Σύνθεση των ενώσεων 5α-θ 104
<u>Σχήμα 2.3:</u> Μηχανισμός σχηματισμού αμιδίου Weirenb
<u>Σχήμα 2.4:</u> Μηχανισμός σχηματισμού υποκατεστημένων ακετυλενικών κετονών
<u>Σχήμα 2.5:</u> Μηχανισμός απομάκρυνσης της <i>t</i> -βουτυλοδιμεθυλοσιλυλομάδας με τη
χρήση υδροφθορικής πυριδίνης109
<u>Σχήμα 3.1:</u> Σύνθεση της ένωσης 6 113
<u>Σχήμα 3.2:</u> Μηχανισμός εποξείδωσης Corey-Chaykovsky
<u>Σχήμα 3.3:</u> Σύνθεση της ένωσης 9 115
<u>Σχήμα 3.4:</u> Μεταβατικές καταστάσεις οι οποίες μεσολαβούν στο σχηματισμό των
διαστερεοϊσομερών 8α και 8β στην εποξείδωση τύπου Sharpless
<u>Σχήμα 3.5:</u> Σύνθεση του αναλόγου 13 119
<u>Σχήμα 3.6:</u> Μηχανισμός αντίδρασης Horner-Emmons
<u>Σχήμα 3.7:</u> Σύνθεση και διαχωρισμός των ισομερών ενώσεων 9 και 13
<u>Σχήμα 3.8:</u> Σύνθεση της ένωσης 28 125
<u>Σχήμα 3.9:</u> Μηχανισμός κυκλοπροπανίωσης Simmons-Smith
<u>Σχήμα 3.10:</u> Διαφορετικοί τύποι ολεφινικής μετάθεσης οι οποίοι εφαρμόζονται στην
οργανική σύνθεση
<u>Σχήμα 3.11:</u> Αντιπροσωπευτικότερες δομές καταλυτών ολεφινικής μετάθεσης

<u>Σχήμα 3.12:</u> Μηχανισμός μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου	136
<u>Σχήμα 3.13:</u> Σύνθεση των ενώσεων 18 και 23	137
<u>Σχήμα 3.14:</u> Αντιδράσεις ενυνικής μετάθεσης στην οργανική χημεία	144
<u>Σχήμα 3.15:</u> Προτεινόμενος μηχανισμός της ενυνικής μετάθεσης με κλείσιμο	
δακτυλίου στην περίπτωση ακραίου αλκυνίου	145
<u>Σχήμα 3.16:</u> Συσχέτιση της <i>exo/endo</i> -εκλεκτικότητας με το μέγεθος του	
σχηματιζόμενου δακτυλίου στην ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου	146
<u>Σχήμα 3.17:</u> Σύνθεση των ενώσεων 32 και 35	147
<u>Σχήμα 4.1:</u> Σύνθεση της ένωσης 41 και πρόσδεσή της στη NovaPEG αμινο-ρητίνη	155
<u>Σχήμα 4.2:</u> Μηχανισμός σχηματισμού αμιδικού δεσμού μεταξύ της οξίμης 41 και της	
αμινο-ρητίνης με Ν,Ν΄-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο και 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο	158
<u>Σχήμα 5.1:</u> Μελέτη της δοσοεξάρτησης της αντιαποπτωτικής δράσης της	
δεϋδροεπιανδροστερόνης και των αναλόγων της 6, 9 και 13 σε κύτταρα PC12,	
απουσία ορού	168
<u>Σχήμα 5.2:</u> FACS ανάλυση της αντιαποπτωτικής δράσης της	
δεϋδροεπιανδροστερόνης και των αναλόγων της 6, 9 και 13	169
<u>Σχήμα 5.3:</u> Επίδραση των DHEA, DHEAS και των σπειρο-νευροστεροειδών 6 και 13	
στην έκκριση ντοπαμίνης στα κύτταρα PC12 σε (Α) 5-30 λεπτά και (Β) σε 3-48 ώρες.	
(Γ) Επίδραση των DHEA, DHEAS και των σπειρο-νευροστεροειδών 6 και 13 στην	
παραγωγή ντοπαμίνης στα κύτταρα PC12	176
<u>Σχήμα 5.4:</u> Επίδραση των ενώσεων 6, 9 και 13 στην κυτταρική βιωσιμότητα των	
κυττάρων PC12, HEK293 και HT22	184
<u>Σχήμα 5.5:</u> Επίδραση των ενώσεων 6, 9 και 13 με την πάροδο του χρόνου στο μέσο	
κλινικό αποτέλεσμα στα πειραματόζωα	185
<u>Σχήμα 5.6:</u> Ραβδογράμματα τα οποία δείχνουν την επίδραση των ενώσεων 6, 9 και	
13 (Α) στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, (Β) στην ημέρα έναρξης της ασθένειας	
και (Γ) στο μέγιστο μέσο κλινικό αποτέλεσμα	186
<u>Σχήμα 5.7:</u> Ραβδογράμματα τα οποία δείχνουν την επίδραση των ενώσεων 6, 9 και	
13 στην έκκριση της ωκυτοκίνης (Α) ΙΕΝ-γ, (Β) ΙL-10 και (Γ) ΙL-17	187
<u>Σχήμα 5.8:</u> Επιχρωματισμένα τμήματα δείγματος ιστού από το νωτιαίο μυελό τα	
οποία δείχνουν την επίδραση των ενώσεων 6, 9 και 13 στη φλεγμονή η οποία	
προκαλείται στα πειραματόζωα από την εγκεφαλομυελίτιδα	188

<u>Σχήμα 5.9:</u> Δομές των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 18, 23 και 28	188
<u>Σχήμα 5.10:</u> (A) FACS ανάλυση της αντιαποπτωτικής δράσης της	
δεϋδροεπιανδροστερόνης, του νευροαυξητικού παράγοντα και των αναλόγων της	
18, 23 και 28 , (B) ο άξονας Χ αντιπροσωπεύει την αννεξίνη V-FITC και ο άξονας Υ	
τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων	190
<u>Σχήμα 5.11:</u> Δομή ακινητοποιημένου σε πολυμερές παραγώγου της	
δεϋδροεπιανδροστερόνης 41	192
<u>Σχήμα 5.12:</u> Καταβύθιση των μεμβρανικών υποδοχέων TrkA και p75 ^{NTR} από	
ακινητοποιημένη δεϋδροεπιανδροστερόνη. Το προσδεδεμένο στην αμινο-ρητίνη	
στεροειδές επωάσθηκε με (Ι) ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες TrkA και p75 ^{NTR} , (ΙΙ) με	
εκχυλίσματα από επιμολυσμένα κύτταρα ΗΕΚ293 ^{TrkA} και ΗΕΚ293 ^{p75NTR} και (III)	
κύτταρα PC12 και νωπό εγκέφαλο αρουραίου	194
<u>Σχήμα 6.1:</u> Ενεργειακοί χάρτες για τις ενώσεις 9 και 13 οι οποίοι προέκυψαν μετά	
από περιστροφή των δίεδρων γωνιών τ $_1$ και τ $_2$ με βήμα αύξησης 10°	198
<u>Σχήμα 6.2:</u> Διαμορφομερή ελαχίστης ενέργειας των ενώσεων 9 (Α-Ε) και 13 (Α'-Ε')	
όπως προέκυψαν μετά από συστηματική περιστροφή (grid scan) γύρω από τις	
δίεδρες γωνίες τ1 (17C-20C-21C-O) και τ2 (20C-21C-O-H)	199
<u>Σχήμα 6.3:</u> Υπέρθεση των ενεργειακά ευνοϊκών διαμορφομερών Ε και Ε' των	
ενώσεων 9 και 13 , αντίστοιχα, με τις ενεργειακά βελτιστοποιημένες δομές του	
αναλόγου 6 και της δεϋδροεπιανδροστερόνης	202

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<u>Εικόνα 2.1:</u> ¹ Η NMR της ένωσης 3 106
<u>Εικόνα 2.2:</u> ¹ Η NMR και ¹³ C της ένωσης 4γ 108
<u>Εικόνα 2.3:</u> ¹ Η NMR και ¹³ C της ένωσης 5γ 110
<u>Εικόνα 3.1:</u> ¹ Η NMR της ένωσης 6 114
<u>Εικόνα 3.2:</u> ¹ Η NMR των ενώσεων 8α και 8β 117
<u>Εικόνα 3.3:</u> ¹ Η NMR των ενώσεων 9 και 13 124
<u>Εικόνα 3.4:</u> ¹ Η NMR, ¹³ C, GDQ-COSY, G-HSQC-ad και G-HMBC-ad της ένωσης 28 127-130
<u>Εικόνα 3.5:</u> ¹ Η NMR, ¹³ C, GDQ-COSY, G-HSQC-ad και G-HMBC-ad της ένωσης 18 140-143
<u>Εικόνα 3.6:</u> ¹ Η NMR της ένωσης 33
<u>Εικόνα 3.7:</u> ¹ Η NMR, ¹³ C, GDQ-COSY, G-HSQC-ad και G-HMBC-ad της ένωσης 32 150-153
<u>Εικόνα 4.1:</u> ¹ Η NMR και ¹³ C της ένωσης 41 157
<u>Εικόνα 4.2:</u> Σύγκριση περιοχών των φασμάτων ¹³ C NMR της ένωσης 41 και του
ακινητοποιημένου στεροειδούς επί της ρητίνης159

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<u>Πίνακας 1.1:</u> Δομές των φυσιολογικών νευροστεροειδών
<u>Πίνακας 1.2:</u> Ταξινόμηση των στεροειδογενετικών ενζύμων
<u>Πίνακας 1.3:</u> Νευροστεροειδή και υποδοχείς με τους οποίους αλληλεπιδρούν
<u>Πίνακας 2.1:</u> Αρυλαλκυνυλοανάλογα της πρεγνενολόνης
<u>Πίνακας 3.1:</u> 17-Σπειροκυκλικά ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης
<u>Πίνακας 3.2:</u> Πειραματικές συνθήκες οι οποίες δοκιμάσθηκαν για τη βελτιστοποίηση
της απόδοσης σύνθεσης της 17 <i>8</i> -υδροξυ-17 <i>α</i> -βινυλο-5-ανδροστεν-3 <i>8</i> -όλης
<u>Πίνακας 3.3:</u> Μελέτη της επίδρασης διαφόρων πειραματικών παραμέτρων στην
απόδοση και τη στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης Horner-Emmons
<u>Πίνακας 3.4:</u> Ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλικούς
ακόρεστους αιθερικούς δακτύλιους στη θέση C17131
<u>Πίνακας 3.5:</u> Πειραματικές συνθήκες οι οποίες δοκιμάσθηκαν για τη βελτιστοποίηση
της αλκυλίωσης των τριτοταγών αλκοολών 15 και 20 138
<u>Πίνακας 3.6:</u> Πειραματικές συνθήκες οι οποίες δοκιμάσθηκαν για τη βελτιστοποίηση
της αλκυλίωσης των τριτοταγών αλκοολών 20 και 29 148
<u>Πίνακας 5.1:</u> Αντιπολλαπλασιαστική δράση των αρυλαλκυνυλοαναλόγων της
πρεγνενολόνης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές LNCaP, Α549 και MCF7 163-164
<u>Πίνακας 5.2:</u> Βιολογική δράση των 17-σπειροκυκλικών εποξειδίων 6, 9 και 13 στα
κύτταρα PC12 σε συνθήκες στέρησης ορού167
<u>Πίνακας 5.3:</u> Ρύθμιση της έκφρασης των εξαρτώμενων από τους υποδοχείς
οιστρογόνων γονιδίων αναφοράς από τα σπειρο-νευροστεροειδή 6, 9 και 13
<u>Πίνακας 5.4:</u> Επίδραση των σπειρο-νευροστεροειδών 6, 9 και 13 στην ανάπτυξη των
καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από ενδοκρινο-εξαρτώμενους όγκους
<u>Πίνακας 6.1:</u> Τιμές ενέργειας και δίεδρων γωνιών $ au_1$ και $ au_2$ οι οποίες αντιστοιχούν
στα ενεργειακά ευνοϊκά διαμορφομερή των εποξειδίων 9 και 13
<u>Πίνακας 6.2:</u> Τιμές ενέργειας των διαμορφομερών Ε και Ε' των ενώσεων 9 και 13,
αντίστοιχα, καθώς και της ένωσης 6 και της δεϋδροεπιανδροστερόνης μετά από
εφαρμογή αλγορίθμων ελαχιστοποίησης της ενέργειας

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Διευθύντριας Ερευνών Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u> ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα στεροειδή είναι οργανικά μόρια των οποίων η δομή βασίζεται σε ένα τετρακυκλικό σύστημα συμπυκνωμένων αλειφατικών δακτυλίων. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα **1.1**, οι δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ Δ, αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται ξεκινώντας από το δακτύλιο Α. Οι τρεις εξαμελείς δακτύλιοι (Α, Β, Γ) έχουν διαμόρφωση τύπου ανάκλιντρου, ενώ ο πενταμελής δακτύλιος έχει διαμόρφωση 14*α* φακέλου (οι δακτύλιοι Γ και Δ είναι ενωμένοι υπό μορφή *trans*).



Σχήμα 1.1: Γενική δομή στεροειδών και η αρίθμησή τους.

Τα στεροειδή απαντώνται σε φυτά (π.χ. φυροστερόλες), ζώα και μύκητες (π.χ. εργοστερόλες). Στα ζώα και τους μύκητες τα στεροειδή παράγονται στα κύτταρα από τη λανοστερόλη, ενώ στα φυτά παράγονται από την κυκλοαρτενόλη. Ωστόσο, και η λανοστερόλη και η κυκλοαρτενόλη προέρχονται από την κυκλοποίηση του τριτερπενίου σκουαλενίου.

Στον άνθρωπο, τα περισσότερα στεροειδή λειτουργούν ως ορμόνες, δηλαδή ως "χημικοί αγγελιοφόροι" οι οποίοι εκκρίνονται από τους αδένες και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται σε συγκεκριμένους ιστούς. Οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να διακριθούν σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με τους υποδοχείς στους οποίους προσδένονται: γλυκοκορτικοειδή, αλατοκορτικοειδή, ανδρογόνα, οιστρογόνα και προγεστογόνα. Τα γλυκοκορτικοειδή (π.χ. κορτιζόνη) και τα αλατοκορτικοειδή (π.χ. αλδοστερόνη) ανήκουν στα αδρενοκορτικοειδή, εκκρίνονται από τα επινεφρίδια και η μεν πρώτη κατηγορία συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και στον έλεγχο των φλεγμονών, η δε δεύτερη ρυθμίζει την ισορροπία των ιόντων Na⁺ και K⁺ στα κυτταρικά υγρά και ελέγχει το μηχανισμό διόγκωσης στους ιστούς. Τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα και τα προγεστογόνα ανήκουν στις γεννητικές ορμόνες. Τα ανδρογόνα (π.χ. τεστοστερόνη, ανδροστερόνη) είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των δευτερευόντων ανδρικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της εφηβείας και την ανάπτυξη ιστών και μυών, συντίθενται δε στους όρχεις από τη χοληστερόλη. Τα οιστρογόνα (π.χ. οιστρόνη, 3,17*β*οιστραδιόλη) είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των δευτερευόντων φυναικείων χαρακτηριστικών και τη ρύθμιση της εμμηνόρροιας, ενώ βιοσυντίθενται στις ωοθήκες από την τεστοστερόνη. Τέλος, τα προγεστογόνα (π.χ. προγεστερόνη) είναι απαραίτητες για την προπαρασκευή της μήτρας προκειμένου να δεχτεί το γονιμοποιημένο ωάριο κατά τη διάρκεια της κύησης.

Φυσικά, θα πρέπει να αναφερθούν και τα συνθετικά στεροειδή τα οποία έχουν παρασκευασθεί σε φαρμακευτικά εργαστήρια για ερευνητικούς σκοπούς και στα οποία ανήκουν τα αντισυλληπτικά και τα αναβολικά¹.

1.2 Νευροστεροειδή

Οι στεροειδείς ορμόνες συντίθενται σε περιφερειακά όργανα και μπορούν να δράσουν σε γονιδιακό επίπεδο, προκαλώντας αλλαγές στη διάθεση και τη συμπεριφορά. Αυτά τα φαινόμενα αναπτύσσονται σχετικά αργά και συνεχίζουν να υφίστανται για αρκετό διάστημα μετά την εξάλειψη των στεροειδών από τον εγκέφαλο. Αντίθετα, κάποια στεροειδή μπορούν να προκαλέσουν άμεσες αλλαγές στη νευρική διέγερση σε χρόνο ο οποίος αποκλείει τη δράση σε γονιδιακό επίπεδο². Ειδικότερα, στις αρχές της δεκαετίας του 1940 ο Selye ανέφερε ότι πολλά στεροειδή, όπως η προγεστερόνη, η δεϋδροεπιανδροστερόνη και πολλοί μεταβολίτες τους, μπορούσαν να επάγουν τη νάρκωση και την αναισθησία^{3,4}.

Η αποκάλυψη ότι συγκεκριμένα στεροειδή μπορούν να συντεθούν *de novo* στον εγκέφαλο και ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους μη κλασικούς υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος τύπου Α (GABA_A)^{5,6} και του *N*-μεθυλο-Dασπαρτικού οξέος (NMDA)⁷ οδήγησε στην εξέλιξη ενός νέου πεδίου. Πιο

συγκεκριμένα, τη δεκαετία του 1980 ο Baulieu και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι στεροειδή όπως η πρεγνενολόνη (PREG), η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), οι εστέρες τους με θειϊκό οξύ, καθώς και με λιπαρά οξέα απαντήθηκαν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ιστούς του νευρικού συστήματος (εγκέφαλος και περιφερικοί νευρώνες) σε σύγκριση με το πλάσμα^{8,9}. Παρόλο που αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί ως αποτέλεσμα της περιφερικής σύνθεσης των στεροειδών και της συσσώρευσής τους από τον εγκέφαλο, βρέθηκε ότι τα στεροειδή αυτά παρέμεναν στο νευρικό σύστημα επί μακρόν, ακόμα και μετά από γοναδεκτομή (χειρουργική απομάκρυνση των γονάδων, δηλαδή των ωοθηκών ή των όρχεων) ή επινεφριδεκτομή (χειρουργική αφαίρεση των επινεφριδίων)¹⁰. Αυτές οι παρατηρήσεις παρέπεμψαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι τα στεροειδή αυτά είτε συντίθενται de novo στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ και ΠΝΣ, αντίστοιχα) είτε έχουν την τάση να συσσωρεύονται στις περιοχές αυτές. Στα εν λόγω στεροειδή αποδόθηκε η ονομασία νευροστεροειδή, για να υποδηλώνεται η ασυνήθιστη προέλευσή τους και για να διαφοροποιούνται από τα στεροειδή τα οποία κλασικά προέρχονται από τα στεροειδογενετικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των γονάδων, των επινεφριδίων και του πλακούντα¹¹. Σήμερα ο αρχικός αυτός ορισμός έχει τροποποιηθεί, ώστε να χρησιμοποιείται και για τα νευροδραστικά στεροειδή τα οποία παράγονται στον εγκέφαλο, αλλά και για τα στεροειδή τα οποία προέρχονται από περιφερικά συστήματα και μεταβολίζονται σε νευροδραστικά παράγωγα επίσης στον εγκέφαλο¹².

Στη συνέχεια, το ερώτημα το οποίο έπρεπε να απαντηθεί ήταν αν τα νευροστεροειδή συντίθενται στον εγκέφαλο ή συσσωρεύονται στο νευρικό σύστημα. Πολλές ήταν οι ερευνητικές ομάδες οι οποίες ασχολήθηκαν με το παραπάνω ζήτημα και, τελικά, κατέληξαν ομόφωνα ότι όντως τα ένζυμα που εμπλέκονται στην κλασική στεροειδογένεση εντοπίζονται στο νευρικό σύστημα και, επομένως, είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των νευροστεροειδών¹³. Όμως, θα πρέπει να τονισθεί ότι το νευρικό σύστημα διαθέτει επιπλέον ένζυμα για την τροποποίηση των στεροειδών¹⁴.

Τα νευροστεροειδή επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασής τους με κλασικούς ενδοκυττάριους πυρηνικούς υποδοχείς (intracellular nuclear receptors) ή επιδρούν στη νευροδιαβίβαση μέσω

αλληλεπίδρασής τους με μεμβρανικούς ιονοτρόπους υποδοχείς (ion-gated receptors) και άλλους νευροδιαβιβαστικούς υποδοχείς (neurotransmitter receptors)¹⁵. Στον Πίνακα **1.1** παρατίθενται μερικά από τα αντιπροσωπευτικότερα φυσιολογικά νευροστεροειδή: αλλοπρεγνανολόνη (allopregnanolone, Allo), προγεστερόνη (progesterone, PROG), πρεγνενολόνη (pregnenolone, PREG), δεϋδροεπιανδροστερόνη (dehydroepiandrosterone, DHEA), θειϊκός εστέρας της πρεγνενολόνης (PREGS) και θειϊκός εστέρας της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS).



Πίνακας 1.1: Δομές των φυσιολογικών νευροστεροειδών.

1.3 Ένζυμα στεροειδογένεσης

Τα νευροστεροειδή συντίθενται από τη χοληστερόλη στο κεντρικό και περιφερικό σύστημα μέσω διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων. Τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη νευροστεροειδογένεση ανήκουν σε δύο κύριες κατηγορίες: α) στα κυτοχρωμικά ένζυμα P450 και β) στα μη-P450 ένζυμα. Στον Πίνακα **1.2** παρατίθενται τα ένζυμα στεροειδογένεσης και οι αντίστοιχοι συμπαράγοντές τους¹⁴.

Κυτ ένζ	οχρωμικά Όμα Ρ450	Συμπαράγοντες	Κυτοχρωμικά ένζυμα μη-Ρ450
	P450scc	Αδρενοδοξίνη	3 <i>6</i> -HSD
Μιτοχονδριακά	Ρ45011β	Αναγωγάση της	11 <i>8</i> -HSD
ένζυμα		αδρενοδοξίνης	
	P450c11AS	—	17 <i>6</i> -HSD
	P450c17	b5	5 <i>α</i> -αναγωγάση
	P450c21	Ρ450 αναγωγάση	3α-HSD
Μικροσωμικά	P450aro	—	STS
ένζυμα	Ρ450-7α-υδροξυλάση	—	HST
	20α-υδροξυλάση	—	—

Πίνακας 1.2: Ταξινόμηση των στεροειδογενετικών ενζύμων.

Τα νευροστεροειδογενετικά ένζυμα μπορεί να είναι μιτοχονδριακά ή μικροσωμικά, παρόλο που ο ακριβής εντοπισμός ορισμένων ενζύμων παραμένει αμφιλεγόμενος. Πάντως, η παρουσία των ενζύμων αυτών στο νευρικό σύστημα έχει διαπιστωθεί από ανάλυσεις ενζυματικής δραστικότητας, έκφρασης πρωτεϊνών και επιπέδων μεταγραφικού mRNA από διάφορα τμήματα νευρικού ιστού με μοναδική εξαίρεση το ένζυμο P450c21, το οποίο δεν έχει εντοπιστεί στο νευρικό σύστημα^{14,16,17}.

Ο όρος κυτοχρωμικό ένζυμο P450 (CYP) περιλαμβάνει μία μεγάλη ομάδα διαφόρων ενζύμων τα οποία αποτελούνται από πεντακόσια αμινοξέα. Πρόκειται για πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν ένα μόριο αίμης (heme-proteins) (Σχήμα **1.2**), απαντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς^{18,19} και είναι οι κύριοι βιοκαταλύτες του μεταβολισμού φαρμάκων και της βιοενεργοποίησης, διεργασίες οι οποίες αντιστοιχούν περίπου στο 75% του συνολικού αριθμού των μεταβολικών αντιδράσεων²⁰. Επίσης, συχνά συνενώνονται και σχηματίζουν αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων (P450-containing systems). Το όνομά τους οφείλεται στην ενδοκυττάριά τους θέση — βρίσκονται κυρίως στα μιτοχόνδρια ή στα μικροσωμάτια — και στη χαρακτηριστική απορρόφηση την οποία παρουσιάζουν στα 420-450 nm, όταν το ανηγμένο άτομο σιδήρου της αίμης σχηματίζει ένωση προσθήκης με το μονοξείδιο του άνθρακα.



Σχήμα 1.2: Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής του ανθρώπινου κυτοχρωμικού P450 ισοένζυμου 2C9 με την ομάδα της αίμης να είναι ορατή στο κέντρο²¹.

Τα κυτοχρωμικά ένζυμα Ρ450 είναι μονο-οξυγονάσες προσδεδεμένες σε αίμη (heme-binding monooxygenases) και καταλύουν την οξειδωτική μετατροπή διαφόρων υποστρωμάτων, τα οποία μπορεί να είναι μεταβολικά ενδιάμεσα, όπως στεροειδείς ορμόνες και λιπίδια, καθώς και ξενοβιοτικές ουσίες, όπως φάρμακα και τοξίνες²². περιβαλλοντικές Αντίθετα, άλλες τοξικές ουσίες, και τα στερεοειδογενετικά ένζυμα Ρ450 έχουν περιορισμένα και ειδικά στεροειδικά υποστρώματα. Ανάγουν το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια από το ανηγμένο φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADPH), το οποίο απαιτεί τη δράση ειδικών συμπαραγόντων, ενώ για την εμφάνιση δράσης είναι απαραίτητη η συμμετοχή εξειδικευμένων για κάθε οργανίδιο ενδιάμεσων

φορέων μεταφοράς ηλεκτρονίων, ένας εκ των οποίων είναι πάντα η φλαβοπρωτεΐνη.

Τέλος, τα P450 ένζυμα προέρχονται από μοναδιαία γονίδια σε διάφορα είδη, αλλά μπορούν να δράσουν σε περισσότερα από ένα στάδια ενζυμικών αντιδράσεων^{23,24}. Παραδείγματος χάριν, το κυτόχρωμα P450scc καταλύει τρεις χημικές αντιδράσεις: την 20α-υδροξυλίωση, την 22-υδροξυλίωση και την οξειδωτική διάσπαση των ανθρακικών δεσμών C20 και C22 της χοληστερόλης. Ομοίως, το ένζυμο P450c17 εκδηλώνει διπλή δράση, επιδρώντας ως υδροξυλάση και ως λυάση. Στην πρώτη περίπτωση, μεσολαβεί στη 17α-υδροξυλίωση της πρεγνενολόνης ή της προγεστερόνης με σχηματισμό της 17α-υδροξυπρεγνενολόνης ή της 17αυδροξυπρογεστερόνης, αντίστοιχα — στη δεύτερη περίπτωση, διασπά τους δεσμούς C17 και C20 αυτών των αναλόγων προς σχηματισμό της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) ή της ανδροστενοδιόνης, αντίστοιχα.

Αντιθέτως, τα μη P450 ένζυμα, όπως οι υδροξυλάσες των στεροειδών 178-HSD και 38-HSD, προέρχονται από πολλαπλά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες. Κάθε μία από τις πρωτεΐνες οι οποίες προκύπτουν μεσολαβεί στην πραγματοποίηση συγκεκριμένων αντιδράσεων, όπως φαίνεται στο Σχήμα **1.3**. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί μέσω της απομόνωσης και της κλωνοποίησης των αντίστοιχων συμπληρωματικών DNA¹⁵.

Η σύνθεση των στεροειδών και των νευροστεροειδών στα επινεφρίδια, τις γονάδες και τον πλακούντα εξαρτάται από την έκφραση των στεροειδογενετικών ενζύμων στους συγκεκριμένους ιστούς και κύτταρα. Για παράδειγμα, τα ένζυμα P450c11*β* και P450c11AS εκφράζονται αποκλειστικά στα επινεφρίδια, με συνέπεια στη συγκεκριμένη περιοχή το πρώτο ένζυμο να καταλύει τη σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών και το δεύτερο ένζυμο να καταλύει τη σύνθεση των αλατοκορτικοειδών στη σπειροειδή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων. Κατά ανάλογο τρόπο, η έκφραση του ενζύμου P450c17 στους όρχεις είναι απαραίτητη για την παραγωγή ανδρογόνων, ενώ η έκφραση του ενζύμου P450aro στις ωοθήκες καθορίζει την παραγωγή οιστρογόνων.



Σχήμα 1.3: Η έκφραση των νευροστεροειδογενετικών ενζύμων στο νευρικό σύστημα (Α) των ενήλικων (P450: ένζυμα του κυτοχρώματος P450, HSD: υδροξυστεροειδοδεϋδρογονάση, STS: σουλφοτρανσφεράση, reductace: αναγωγάση) και (Β) των εμβρύων¹⁴.

Στο νευρικό σύστημα, η σύνθεση των νευροστεροειδών και η έκφραση των στερεοειδογενετικών ενζύμων συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας πιο πολύπλοκης διαδικασίας. Ειδικότερα, η έκφραση των ενζύμων δεν είναι μόνο τοπο-ειδική εντός του κυττάρου, αλλά και κυτταρο-ειδική, δεδομένου ότι τα ένζυμα παράγονται στη γλοία και στους νευρώνες, και ρυθμίζεται από την ανάπτυξη²⁵. Αυτά υποδεικνύουν ότι συγκεκριμένοι μεταβολίτες μπορεί να διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο

αποκλειστικά κατά την ανάπτυξη, χωρίς να είναι απαραίτητη η έκφρασή τους κατά ενηλικίωση. Αντιθέτως, 0 σταθερός εντοπισμός την και έκφραση στεροειδογενετικών ενζύμων σε περιοχές του εγκεφάλου καταδεικνύει τη σημασία των αντίστοιχων μεταβολιτών καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης. Διάφορες ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να αποδείξουν την ταυτόχρονη παρουσία κάποιων ενζύμων σε ολόκληρο εγκέφαλο, σε νευρώνες και γλοιακά κύτταρα. Για παράδειγμα, το ένζυμο P450c17 απαντάται τόσο στα κυτταρικά σώματα, όσο και στους νευράξονες και τους δενδρίτες²⁶, ενώ τα αστροκύτταρα τύπου 1 και τα κύτταρα Schwann εκφράζονται μόνο στους νευρώνες ή μόνο στη γλοία^{11,27}. Κατ΄ επέκταση, και η σύνθεση των στεροειδών πιθανόν να πραγματοποιείται μέσω παρόμοιων, αλλά διαφορετικών "μονοπατιών" από αυτά τα οποία λειτουργούν στα επινεφρίδια, τις γονάδες και τον πλακούντα¹⁵. Επίσης, κάποια ένζυμα μπορεί να είναι δραστικά στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων και άλλα να δραστηριοποιούνται στους νευρώνες ή/και τους δενδρίτες των νευρώνων, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι υπάρχει η πιθανότητα τα νευροστεροειδή να συντίθενται και να αποδεσμεύονται σε απομακρυσμένες περιοχές του νευρικού συστήματος.

Τέλος, ο εγκέφαλος διαθέτει επιπλέον ένζυμα τα οποία μεταβολίζουν τα στεροειδή, μετατρέποντας κλασικές στεροειδείς ορμόνες σε μια ποικιλία νευροδραστικών στεροειδών. Σε αυτά τα ένζυμα συγκαταλέγονται σουλφοτρανσφεράσες¹³, σουλφοϋδρολάσες¹³, το ένζυμο 7*α*-υδροξυλάση το οποίο εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο^{28,29} και οι 24-υδροξυλάση³⁰ και 26*α*-υδροξυλάση³¹. Φυσικά, οι έρευνες συνεχίζονται για να διευκρινισθεί ο τρόπος σύνθεσης ή μεταβολισμού των στεροειδών σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, πληροφορίες οι οποίες θα διαφωτίσουν και τον τρόπο λειτουργίας των νευροστεροειδών.

1.4 Βιοσύνθεση των νευροστεροειδών

Η πρώτη φάση της στεροειδογένεσης περιλαμβάνει τη δέσμευση της χοληστερόλης από τον περιφερικού-τύπου υποδοχέα βενζοδιαζεπίνης (PBR). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της στεροειδογόνου οξείας ρυθμιστικής πρωτεΐνης (StAR)³²⁻³⁴ η χοληστερόλη εισάγεται στα μιτοχόνδρια των γλοιακών κυττάρων και

των νευρώνων του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος³⁵, όπου και λαμβάνει χώρα η βιοσύνθεση των στεροειδών, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων καταλυόμενες από τα στεροειδογενετικά ένζυμα. Στη στεροειδογένεση, το πρώτο στάδιο το οποίο καθορίζει την ταχύτητα σχηματισμού όλων των στεροειδών ορμονών και το οποίο είναι ορμονικά ρυθμιζόμενο είναι η μετατροπή της χοληστερόλης προς πρεγνενολόνη. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται και στον εγκέφαλο και στους κλασικούς ενδοκρινείς ιστούς^{32,36} και καταλύεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο P450scc το οποίο διασπά την πλευρική αλυσίδα της χοληστερόλης σε τρία διαδοχικά στάδια: α) 20αυδροξυλίωση, β) 22-υδροξυλίωση και γ) διάσπαση του ανθρακικού δεσμού C20-C22 της χοληστερόλης. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι η πρεγνενολόνη (PREG) και το ισοκαπροϊκό οξύ, ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι σε όλους τους στεροειδογενετικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου, απαντάται ένα μόνο είδος του ενζύμου P450scc^{28,29}.

Στη συνέχεια, η πρεγνενολόνη με τη βοήθεια εξειδικευμένων ενζύμων μπορεί να μετατραπεί σε όλους τους τύπους των στεροειδών ορμονών. Κατ' αρχήν, μπορεί είτε να υδροξυλιωθεί στη 17-θέση από το μικροσωμικό ένζυμο P450c17, σχηματίζοντας τη 17α-υδροξυπρεγνενολόνη, είτε να μετατραπεί στην προγεστερόνη (PROG) μέσω του ενζύμου 3*6*-HSD το οποίο εκφράζεται σε νευρώνες και γλοία^{13,37}. Όσον αφορά στην υδροξυλίωση στη 17-θέση, είναι γνωστό ότι υπάρχει μια εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα: κάποια είδη προτιμούν τα Δ⁵-στεροειδή (π.χ. πρεγνενολόνη) και κάποια άλλα προτιμούν τα Δ⁴-στεροειδή (π.χ. προγεστερόνη)³⁸.

Н 17α-υδροξυπρεγνενολόνη πρόδρομη αποτελεί ένωση της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) και θειϊκού εστέρα του της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS). Παρουσία του ενζύμου P450c17 μετατρέπεται σε δεϋδροεπιανδροστερόνη η οποία με τη σειρά της μετασχηματίζεται σε ανδρογόνα μέσω των ιστοειδικών ενζύμων 178-HSD. Αρχικά, σχηματίζει την ανδροστενοδιόλη, η οποία με επίδραση του ενζύμου 38-HSD παράγει την τεστοστερόνη. Η δε τεστοστερόνη μέσω της αρωματάσης P450aro οδηγεί στην 3,17β-οιστραδιόλη, ενώ μέσω της 5α-αναγωγάσης οδηγεί στη διϋδροτεστοστερόνη (DHT).

Παράλληλα, η προγεστερόνη είναι ο πρόδρομος μεταβολίτης των γλυκοκορτικοειδών, των αλατοκορτικοειδών, αλλά και άλλων νευροστεροειδών, δεδομένου ότι μπορεί να είναι πρόσφορο υπόστρωμα για μια ποικιλία ενζύμων. Η σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών (κορτικοστερόνη στα τρωκτικά και κορτιζόλη στους ανθρώπους) και των αλατοκορτικοειδών (αλδοστερόνη) επιτυγχάνεται μέσω της 21-υδροξυλίωσης της προγεστερόνης από τη συνδυασμένη δράση δύο ενζύμων: του μικροσωμικού ένζυμου P450c21 και ακολούθως, του ενζύμου P450c11. Αναλυτικότερα, το ένζυμο P450c11β μεσολαβεί στην παραγωγή κορτικοστερόνης στη στηλιδωτή ζώνη/δικτυωτή ζώνη, ενώ το P450c11AS δραστηριοποιείται στη σπειραματική ζώνη για την παραγωγή αλδοστερόνης. Το ένζυμο P450c17 παρουσιάζει διττή δράση 17-υδροξυλάσης και 17,20-λυάσης. Στον ανθρώπινο οργανισμό, η ρύθμιση του τρόπου δράσης του εν λόγω ενζύμου είναι ο παράγοντας ο οποίος και καθορίζει τη σύνθεση γλυκοκορτικοειδών (μόνο δράση 17υδροξυλάσης) ή δεϋδροεπιανδροστερόνης (δράση 17-υδροξυλάσης και 17,20λυάσης).

Στη σύνθεση άλλων νευροστεροειδών χρησιμοποιούνται δύο είδη ενζύμων: η 5α-αναγωγάση και η 3α-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογονάση (3α-HSD). Η δράση αυτών των ενζύμων στην προγεστερόνη παράγει την 11-δεοξυκορτικοστερόνη (DOC) και την 5α-διϋδροπρογεστερόνη (DHP). Η 5α-αναγωγάση μπορεί να επιδράσει περαιτέρω στις δύο προηγούμενες ενώσεις και να τις μετασχηματίσει στα αντίστοιχα ανηγμένα παράγωγά τους 5α-διϋδροδεοξυκορτικοστερόνη (DH-DOC) και διϋδροτεστοστερόνη (DHT). Κατόπιν, οι 5α-διϋδροπρογεστερόνη και 5αδιϋδροδεοξυκορτικοστερόνη μπορούν να μετασχηματισθούν στα 3α-ανηγμένα ανάλογά τους ως υποστρώματα του ενζύμου 3α-HSD. Οι αντιδράσεις αυτές είναι αντιστρεπτές και το αποτέλεσμά τους εξαρτάται από την κυτταρική περιοχή στην οποία εντοπίζονται το ένζυμο και το υπόστρωμα. Αυτό ισχύει για τον ανθρώπινο οργανισμό ο οποίος διαθέτει διάφορα 3α-HSD γονίδια τα οποία εμφανίζουν εκλεκτικότητα υποστρώματος, εν αντιθέσει με τα τρωκτικά τα οποία εμφανίζουν μόνο ένα 3α-HSD γονίδιο το οποίο καταλύει όλες τις παραπάνω αντιδράσεις^{39,40}. Συνεπώς, η ταυτότητα των νευροστεροειδών ή των μεταβολιτών τους, τα οποία θα παραχθούν στο κεντρικό ή περιφερικό σύστημα, καθορίζεται από πολλές παραμέτρους, όπως ο συγχρονισμός κατά την ανάπτυξη, η εξειδίκευση στην
έκφραση όλων των παραπάνω ενζύμων, τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση των στεροειδών τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και στο στάδιο της ανάπτυξης, και τα ενζυμικά υποστρώματά τους σε συγκεκριμένους ιστούς (διάφορες εγκεφαλικές περιοχές), σε συγκεκριμένα κύτταρα (νευρώνες ή γλοία) και σε συγκεκριμένες κυτταρικές περιοχές (κυτταρικά σώματα, ίνες)^{15,41}.

Στο Σχήμα **1.4** αναπαρίσταται το βιολογικό μονοπάτι το οποίο αποτελεί τη βάση για τη σύνθεση των νευροστεροειδών^{12,13}.



Σχήμα 1.4: Βιοσύνθεση των νευροστεροειδών στο νευρικό σύστημα και νευροστεροειδογενετικά ένζυμα τα οποία συμμετέχουν σε αυτή⁴².

1.5 Εγκεφαλικά κύτταρα σύνθεσης των νευροστεροειδών

Τα εγκεφαλικά κύτταρα στα οποία παρατηρείται νευροστεροειδογένεση είναι τα εξής:

1. **Γλοιακά κύτταρα**. Είναι γνωστά ως γλοία ή νευρογλοία (Σχήμα **1.5**). Πρόκειται για κύτταρα τα οποία διατηρούν την ομοιόσταση, σχηματίζουν μυελίνη και παρέχουν στήριξη και προστασία στους νευρώνες. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο, ένα γλοιακό κύτταρο αντιστοχεί σε κάθε νευρώνα, ενώ στη φαιά ουσία η αντιστοιχία είναι τρία προς δύο⁴³. Οι κύριες λειτουργίες της γλοίας είναι να περιβάλλει και να συγκρατεί τους νευρώνες στη θέση τους, να παρέχει θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο στους νευρώνες, να μονώνει τον ένα νευρώνα από τον άλλο, καθώς και να καταστρέφει παθογόνα και να απομακρύνει τους νεκρούς νευρώνες. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευροδιαβίβαση, παρόλο που δεν έχει διαλευκανθεί η συμβολή της στο μηχανισμό αυτής της διεργασίας^{44,45}. Διακρίνεται σε δύο τύπους, τη μικρογλοία και τη μακρογλοία. Η μακρογλοία διακρίνεται σε διάφορους τύπους κυττάρων. Παραδειγματικά, αναφέρουμε τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα τα οποία βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα ή τα κύτταρα Schwann τα οποία ανήκουν στο περιφερικό νευρικό σύστημα.

Στα θηλαστικά τα γλοιακά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των νευροστεροειδών και στο μεταβολισμό τους στον εγκέφαλο. Συνεπώς, και η έκφραση και η δραστικότητα του πολύ σημαντικού ενζύμου P450scc στα γλοιακά κύτταρα έχει διερευνηθεί τόσο ανοσοϊστοχημικά, όσο και βιοχημικά. Τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα αστροκύτταρα είναι οι πρωταρχικές περιοχές όπου συντίθεται η πρεγνενολόνη⁴⁶⁻⁵¹. Πιο συγκεκριμένα, βιοχημικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα μιτοχόνδρια των ολιγοδενδροκυττάρων, τα οποία παράγουν μυελίνη της λευκής ουσίας του εγκεφάλου, μετατρέπουν τη χοληστερόλη σε πρεγνενολόνη⁴⁶.



Σχήμα 1.5: Γλοιακά κύτταρα εγκεφάλου.

2. Νευρώνες Purkinje. Πρόκειται για μια κατηγορία GABAεργικών νευρώνων οι οποίοι εντοπίζονται στον παρεγκεφαλικό φλοιό (Σχήμα 1.6). Είναι από τους μεγαλύτερους νευρώνες και είναι οι μοναδικοί συντονιστές των μηχανικών κινήσεων στο φλοιό της παρεγκεφαλίδας. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι νευρώνες παρεγκεφαλίδας εκφράζουν τα ένζυμα P450scc και 3*θ*-HSD, ενώ παράγουν πρεγνενολόνη, θειϊκή πρεγνενολόνη και προγεστερόνη σε ορισμένα σπονδυλωτά είδη⁵²⁻⁵⁶. Η έκφραση του ενζύμου P450scc ενεργοποιείται στους νευρώνες Purkinje αμέσως μετά τη διαφοροποίησή τους και το γονίδιο παραμένει ενεργό από την νεογνική ηλικία έως την ενηλικίωση⁵⁵. Οι νευρώνες Purkinje κατά την νεογνική ζωή



Σχήμα 1.6: Νευρώνες Purkinje.

3. Άλλοι νευρώνες. Ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη στεροειδογένεση, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων StAR⁵⁷, CYP11A1⁵⁸ και της 5*α*-αναγωγάσης⁵⁹,

έχουν εντοπιστεί σε πυραμιδικούς νευρώνες και στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου⁶⁰. Επιπλέον, το γονίδιο P450scc έχει βρεθεί όιτι εκφράζεται σε νευρώνες του αμφιβληστροειδικού γαγγλίου, σε αισθητικούς νευρώνες της πρόσθιας ρίζας των γαγγλίων και σε κινητικούς νευρώνες στον νωτιαίο μυελό του αρουραίου^{61,62}. Γενικότερα, πρόσφατες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι οι κύριοι διεγερτικοί νευρώνες έχουν κυρίαρχο ρόλο στη σύνθεση των νευροστεροειδών στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

1.6 Μηχανισμός δράσης νευροστεροειδών

Τα νευροστεροειδή εκδηλώνουν τη βιολογική τους δράση στον εγκέφαλο κατά την εμβρυογένεση, αλλά και κατά την ενηλικίωση. Μία από τις πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με την επίδραση των νευροστεροειδών στο νευρικό σύστημα ήταν οι αναισθητικές ιδιότητες της προγεστερόνης⁶³. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η προγεστερόνη και τα παράγωγά της επιδρούν στο νευρικό σύστημα περιλαμβάνουν την αυτο/παρακρινική επίδραση (auto/paracrine effect), γονιδιακές δράσεις (genomic) μέσω πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών και μη γονιδιακές δράσεις (non-genomic) μέσω υποδοχέων νευροδιαβιβαστών^{6,64}, ενώ πρόσφατα αναφέρθηκαν και δράσεις των νευροστεροειδών στους λεγόμενους υποδοχείς MAP2. Στο Σχήμα **1.7** απεικονίζονται οι γονιδιακές και μη γονιδιακές δράσεις των νευροστεροειδών.



Σχήμα 1.7: Μη γονιδιακές και γονιδιακές δράσεις των νευροστεροειδών (BDZ: βενζοδιαζεπίνες, R: υποδοχέας, G: G-πρωτεΐνες, PKA: πρωτεΐνική κινάση A, GR: υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, MR: υποδοχέας αλατοκορτικοειδών, PR: υποδοχέας προγεστερόνης, ER: υποδοχέας οιστρογόνων)⁶⁵.

Σε αντίθεση με τις στεροειδείς ορμόνες οι οποίες δρουν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις και μακριά από την περιοχή σύνθεσής τους (endocrine effect), οι νευροστεροειδείς ορμόνες επιδρούν στο νευρικό σύστημα με έναν αυτο/παρακρινικό τρόπο. Αυτό φαίνεται να εξηγεί την επίδραση της προγεστερόνης στην πρωτεϊνοσύνθεση της μυελίνης στα κύτταρα Schwann του ισχιακού νεύρου⁶⁶. Σε αυτά τα γλοιακά κύτταρα παρατηρείται σύνθεση της προγεστερόνης, καθώς και δράση της προγεστερόνης μέσω του πυρηνικού υποδοχέα⁶⁷. Η παραγωγή προγεστερόνης στα προαναφερόμενα κύτταρα ενεργοποιείται από γειτονικούς νευρώνες και με τη σειρά της ενεργοποιεί τις απαιτούμενες για τη μυελίνωση νευρωνικές πρωτεΐνες (neuronal proteins). Ο in situ σχηματισμός και δράση της προγεστερόνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, είναι υπό διερεύνηση και προσδίδει μια άλλη διάσταση στην προγεστερόνη, η οποία δεν αντιμετωπίζεται αποκλειστικά ως ορμόνη φύλου⁶⁸.

Στην περίπτωση της γονιδιακής δράσης, οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή των κυττάρων-στόχων μετά από πρόσδεση σε πυρηνικούς υποδοχείς⁶⁸. Το πρώτο στάδιο στο μηχανισμό αυτό είναι η εισαγωγή του στεροειδούς μέσα στο κύτταρο και η πρόσδεσή του με ένα συγκεκριμένο κυτταροπλασματικό υποδοχέα. Ακολούθως, το σύμπλοκο το οποίο δημιουργείται μεταφέρεται στον πυρήνα και προκαλεί ενεργοποίηση των μεταγραφικών μηχανισμών, με αποτέλεσμα να συντίθενται συγκεκριμένες πρωτεΐνες οι οποίες μεταφέρονται στο σημείο δράσης τους, εντός ή εκτός κυττάρου. Η σειρά των γεγονότων τα οποία μόλις περιγράφηκαν έχει μελετηθεί εκτενώς. Τα συμπληρωματικά DNA (cDNAs) τα οποία κωδικοποιούν τους υποδοχείς των στεροειδών έχουν χαρακτηριστεί και κλωνοποιηθεί, ενώ οι επιδράσεις αναστολέων της πρωτεϊνοσύνθεσης αποδεικνύουν την ορθότητα του παραπάνω μηχανισμού. Ανεξάρτητα από την τοποθεσία σύνθεσής τους, τα γλυκοκορτικοειδή, τα αλατοκορτικοειδή, τα προγεστογόνα, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα μπορούν να ασκούν την επίδρασή τους στον εγκέφαλο μέσω πρόσδεσης στους πυρηνικούς υποδοχείς των νευρικών κυττάρων.

Η κατανομή των πυρηνικών υποδοχέων στον εγκέφαλο έχει επίσης εξετασθεί με μετρήσεις πρόσδεσης, αυτοραδιογραφία επισημασμένων με τρίτιο στεροειδών και ανοσοχημικές μελέτες των πρωτεϊνών των υποδοχέων⁶⁹. Εντούτοις, οι παραπάνω τεχνικές δε διακρίνουν τους υποδοχείς νευροστεροειδών από τους υποδοχείς των περιφερικών στεροειδών. Για παράδειγμα, οι υποδοχείς των νευροδραστικών στεροειδών ορμονών, όπως οι υποδοχείς οιστρογόνων, έχουν περιγραφεί και αλληλεπιδρούν και με τα οιστρογόνα της κυκλοφορίας και με τα οιστρογόνα τα οποία συντίθενται στον υποθάλαμο. Επιπλέον, οι υποδοχείς προγεστερόνης αλληλεπιδρούν με την οιστραδιόλη στους νευρώνες του υποθαλάμου, αλλά όχι στο φλοιό⁷⁰, ενώ ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση απουσία προσδέτη⁷¹. Πειράματα με ανάμεικτες καλλιέργειες γλοιακών κυττάρων από εγκέφαλο επίμυος απέδειξαν την επαγωγή από τα οιστρογόνα του υποδοχέα της προγεστερόνης στα ολιγοδενδροκύτταρα και την αναστολή από την οιστρογονο-εξαρτώμενης προγεστερόνη της κυτταρικής ανάπτυξης και μορφολογικής διαφοροποίησης σε ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα^{67,72}. Παρόλες τις γνώσεις σχετικά με τους υποδοχείς των στεροειδών στους

περιφερικούς ιστούς, δεν είναι εύκολο να καθορίσουμε τη φύση, τις ιδιότητες και τις διαφορές ή ομοιότητες των υποδοχέων αυτών με τους πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι δεν έχουν κλωνοποιηθεί έως τώρα.

Οι μη γονιδιακές δράσεις των νευροστεροειδών έχουν μελετηθεί διεξοδικά^{36,64} και έχει βρεθεί ότι επιτυγχάνονται μέσω της αλληλεπίδρασης τους με υποδοχείς νευροδιαβιβαστών. Αρχικές φαρμακολογικές μελέτες αυτών των αναλόγων έδειξαν ότι τα ανηγμένα ανάλογα της προγεστερόνης αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα GABA_A. Νευροστεροειδή τα οποία προέρχονται από τη δράση του ενζύμου P450c17, όπως η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ο θειϊκός εστέρας της (DHEAS), δρουν ως πιθανοί αλλοστερικοί ρυθμιστές των GABA_A, NMDA και σίγμα υποδοχέων¹⁴. Ο Πίνακας **1.3** παρουσιάζει συνοπτικά τη δράση των νευροστεροειδών στους προαναφερόμενους υποδοχείς^{24,41}.

Υποδοχέας	Νευροστεροειδή	Επίδραση
γ-Αμινο-	3α,5α/β-παράγωγα προγεστερόνης,	
βουτυρικού	τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνη, 11-	Θετική
οξέος τύπου Α	δεοξυκορτικοστερόνη, τεστοστερόνη	
(GABA _A)	Θειϊκός εστέρας πρεγνενολόνης, θεϊκός	Αρνητική
	εστέρας δεϋδροεπιανδροστερόνης	
	3α,5α-τετραϋδροπρογεστερόνη,	
Γλυκίνης	προγεστερόνη, πρεγνενολόνη, θειϊκός	Αρνητική
	εστέρας πρεγνενολόνης, θειϊκός εστέρας	
	δεϋδροεπιανδροστερόνης	
	Δεϋδροεπιανδροστερόνη, θειϊκός εστέρας	Θετική
Σίγμα τύπου 1	δεϋδροεπιανδροστερόνης	
(σ ¹)	Προγεστερόνη, θειϊκός εστέρας	Αρνητική
	πρεγνενολόνης	
Ν-Μεθυλο-	Δεϋδροεπιανδροστερόνη, θειϊκός εστέρας	Θετική
D-ασπαρτικού	πρεγνενολόνης	
οξέος (NMDA)	3,17 <i>8</i> -οιστραδιόλη	Αρνητική
<i>α</i> -Αμινο-3-		
υδροξυ-5-		
μεθυλο-4-	Θειϊκός εστέρας πρεγνενολόνης	Αρνητική
ισοξαζολο-		
προπιονικού		
οξέος (ΑΜΡΑ)		
Καϊνικού οξέος	Προγεστερόνη, 3,178-οιστραδιόλη	Θετική
	Θειϊκός εστέρας πρεγνενολόνης	Αρνητική
Σεροτονίνης	3α,5α-τετραϋδροπρογεστερόνη,	
τύπου 3 (5-HT₃)	προγεστερόνη, τεστοστερόνη, 3,17α/β-	Αρνητική
	οιστραδιόλη	
Νευρωνικός	3α,5α-τετραϋδροπρογεστερόνη,	
νικοτινικός	προγεστερόνη, θειϊκός εστέρας	Αρνητική
ακετυλοχολίνης	πρεγνενολόνης	
(nACh)		
Ωκυτοκίνης	Προγεστερόνη	Αρνητική

Πίνακας 1.3: Νευροστεροειδή και υποδοχείς με τους οποίους αλληλεπιδρούν.

Τέλος, εκτός από τις κλασικές αλληλεπιδράσεις των νευροστεροειδών, έχει ανακαλυφθεί και ένας νέος τρόπος στεροειδικής δραστικότητας, σύμφωνα με τον οποίο τα νευροστεροειδή, όπως η πρεγνενολόνη, μπορούν να δράσουν στο επίπεδο των μικροσωληνίσκων μέσω ενός προτεινόμενου υποδοχέα MAP2⁶⁸. Οι νευρώνες διαθέτουν χαρακτηριστικές νευρικές απολήξεις οι οποίες συμπληρώνονται από παράλληλες συστοιχίες μικροσωληνίσκων. Αυτοί οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνται από τουμπουλίνη και άλλες συναφείς με την τουμπουλίνη πρωτεΐνες (MAPs) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη συντήρηση των νευριτών κατά τη διαφοροποίηση των νευρώνων. Οι πρωτεΐνες MAPs είναι βασικά συστατικά του κυτταροπλάσματος των νευρώνων και ρυθμίζουν το σχηματισμό και τη δυναμική του πλέγματος των μικροσωληνίσκων, ενώ καθορίζουν το σχήμα των νευρώνων και ελέγχουν την ισορροπία ακαμψίας και πλαστικότητας κατά τις διάφορες διεργασίες των νευρώνων^{73,74}. Διακρίνονται σε πρωτεΐνες MAP τύπου I (MAP1), τύπου II (MAP2) ή tau (MAPT). Οι πρωτεΐνες MAP2 εκφράζονται στους νευρώνες και περιορίζονται στους δενδρίτες.

Πειράματα πρόσδεσης της πρεγνενολόνης παρουσία αντιγόνου της πρωτεΐνης MAP2 και μονοκλωνικών αντιγόνων των υπομονάδων *α* και *β* της τουμπουλίνης απέδειξαν την αλληλεπίδραση του στεροειδούς με τον υποδοχέα MAP2. Αναλυτικότερα, επώαση της τουμπουλίνης με την πρωτεΐνη MAP2 οδήγησε σε συμπολυμερές το οποίο αλληλεπιδρά με την πρεγνενολόνη. Επομένως, η κατάλληλη διαμόρφωση του υποδοχέα MAP2 για την πρεγνενολόνη ευνοείται από τον συμπολυμερισμό με την τουμπουλίνη. Η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός εστέρας της επίσης φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα MAP2 σε καλλιέργειες εμβρυϊκών νευρώνων του νεοφλοιού⁷⁵, αλλά ασθενέστερα και με διαφορετικό τρόπο συγκριτικά με την προγεστερόνη. Τέλος, ενώ είχε αναφερθεί προγενέστερα ότι ο μεταβολίτης 2-μεθοξυ-οιστραδιόλη προσδένεται στην τουμπουλίνη απουσία των πρωτεϊνών MAP⁷⁶, ο υποδοχέας MAP2 εμφανίζεται ως νέος υποδοχέας πρόσδεσης των νευροστεροειδών.

Οι μελέτες αυτές διευρύνουν το πεδίο δράσης των νευροστεροειδών, τα οποία πιθανόν να εμπλέκονται στο φυσιολογικό σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Ένα κρίσιμο ερώτημα το οποίο πρέπει να απαντηθεί είναι αν παρατηρείται ανάλογη αλληλεπίδραση σε άλλα κύτταρα εκτός των νευρώνων, ανάμεσα στα οποία και τα καρκινικά κύτταρα, δεδομένου ότι με αυτόν τον τρόπο ίσως τα νευροστεροειδή να μπορούν να συμβάλλουν στην αναστροφή της έλλειψης των μικροσωληνίσκων σε πολλές παθολογικές καταστάσεις⁶⁸.

1.7 Υποδοχείς GABA_A

1.7.1 Γενικά

Η επικοινωνία των νευρώνων στις συνάψεις γίνεται με την έκκριση ειδικών βιοχημικών ουσιών, των νευροδιαβιβαστών. Ανάλογα με το νευροδιαβιβαστή, η δραστηριότητα του κυττάρου-αποδέκτη ενός ερεθίσματος-μηνύματος μπορεί είτε να ανασταλεί, οπότε αναστέλλεται η νευροδιαβίβαση, ή να ενισχυθεί από το "μήνυμα", οπότε σε αυτήν την περίπτωση η νευροδιαβίβαση μεταδίδεται. Το γαμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Ρυθμίζει την απόκριση των νευρώνων σε ολόκληρο το νευρικό σύστημα, ενώ στον άνθρωπο ρυθμίζει και το μυϊκό τόνο⁷⁷ (συνεχής ελαφρά σύσπαση των μυών η οποία φυσιολογικά υπάρχει ακόμη και σε κατάσταση ηρεμίας). Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ δεν μπορεί να διαπεράσει το αιματοεγκεφαλικό φραγμό και επομένως, συντίθεται σε GABAεργικούς νευρώνες από τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή γλουταμικό οξύ^{78,79} παρουσία του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του L-γλουταμικού οξέος, το οποίο απαντάται ως προϊόν των γονιδίων GAD65 και GAD67, και του συμπαράγοντα φωσφορικής πυριδοξάλης (ενεργή μορφή της βιταμίνης Β6). Περίπου το ένα τρίτο των χημικών συνάψεων στον εγκέφαλο, ειδικά εκείνων από μικρούς διάμεσους νευρώνες, χρησιμοποιεί το γ-αμινοβουτυρικό οξύ ως διαβιβαστή και σχεδόν όλοι οι νευρώνες ανταποκρίνονται σε αυτό (Σχήμα 1.8).



Σχήμα 1.8: Παραγωγή, απελευθέρωση, δράση και αποικοδόμηση του γαμινοβουτυρικού οξέος σε μια τυπική GABAεργική σύναψη.

Οι υποδοχείς οι οποίοι μεσολαβούν στην επίδραση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος είναι τουλάχιστον δύο: ο GABA_A και ο GABA_B⁸⁰. Οι υποδοχείς GABA_A είναι δίαυλοι ιόντων χλωρίου και είναι κατανεμημένοι τόσο μετασυναπτικά, όσο και προσυναπτικά⁸¹⁻⁸³. Εκτός από αγωνιστές του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (π.χ. μουσκιμόλη) ή ανταγωνιστές (π.χ. μπικουκουλίνη), με τους υποδοχείς αυτούς αλληλεπιδρά ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών τροποποιητών της δράσης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος, όπως οι βενζοδιαζεπίνες, τα βαρβιτουρικά και τα νευροστεροειδή (θετικοί αλλοστερικοί τροποποιητές) ή η φλουμαζενίλη (αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής) και η πικροτοξίνη (ειδικός αναστολέας του καναλιού ιόντων χλωρίου).

Οι υποδοχείς GABA_B είναι μεταβολοτρόποι υποδοχείς του ενδογενούς γαμινοβουτυρικού οξέος και απαντώνται προσυναπτικά, όπου συνήθως μειώνουν τη συγέντρωση ασβεστίου και μετασυναπτικά, όπου συνήθως αυξάνουν τη συγκέντρωση καλίου. Και στις δύο περιπτώσεις, ασκούν την δράση τους μέσω Gπρωτεϊνών και θεωρούνται ανασταλτικοί υποδοχείς, δεδομένου ότι σταματούν την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, ενώ οργανώνονται σε ετεροδιμερή στις μεμβράνες των νευρώνων^{84,85}. Πιθανότατα εμπλέκονται στον πόνο⁸⁶, ενώ πρόσφατες έρευνες παρέχουν ενδείξεις για ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη⁸⁷. Επιπρόσθετα, οι υποδοχείς GABA_B διεγείρονται από τη βακλοφαίνη και αναστέλλονται από τις σακλοφένη και φακλοφένη.

Τέλος, λιγότερο κοινοί είναι οι GABA_c υποδοχείς οι οποίοι απαντώνται ως επί το πλείστον στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού. Συνδέονται με κανάλι ιόντων χλωρίου και εκτός από το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, ενεργοποιούνται από βασικά δομικά ανάλογά του, αναστέλλονται από το τετραϋδροπυριδινο-4μεθανοφωσφονικό οξύ (TPMPA), ενώ δεν είναι ευαίσθητοι στη μπικουκουλίνη και τη βακλοφαίνη⁸⁸.

1.7.2 Δομή των υποδοχέων GABAA

Οι υποδοχείς GABA_A είναι ιονοτρόποι υποδοχείς και είναι μέλη της υπεροικογένειας των ιοντικών καναλιών (ligand-gated ion channels), στην οποία ανήκουν και κάποιοι γλουταμινεργικοί υποδοχείς. Παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με τους υποδοχείς γλυκίνης και γενικότερα, με τα κανάλια ιόντων χλωρίου, ενώ μικρότερη είναι η συγγένειά τους με τους νικοτινικούς χολινεργικούς υποδοχείς και με την 5-HT₃ υποομάδα των σεροτονικών υποδοχέων, οι οποίοι είναι και οι δυο κατιονικά κανάλια (κυρίως νατρίου)^{89,90}.

Ο υποδοχέας GABA_A είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας των νευρώνων ο οποίος συνίσταται από πέντε διακριτές υπομονάδες διευθετημένες κατάλληλα γύρω από έναν κεντρικό δίαυλο διαμέτρου 6Å. Στα θηλαστικά, για καθεμιά από τις υπομονάδες υπάρχουν διάφοροι τύποι οι οποίοι διαχωρίζονται σε επτά καθορισμένες οικογένειες με ομοιότητες στην αλληλουχία (6 τύποι υπομονάδων *α*, 3 τύποι για τις υπομονάδες *β*,*γ* και *ρ*, ένας τύπος για καθεμιά από τις υπομονάδες *δ*,

ε, *θ*, και *π*)⁸⁹. Κάθε υπομονάδα περιέχει τέσσερις *α*-έλικες οι οποίες διασχίζουν τη μεμβράνη, ενώ ο δίαυλος σχηματίζεται από την προσέγγιση τουλάχιστον μιας έλικας από καθεμιά από τις υπομονάδες. Ένα επίμηκες *Ν*-τελικό τμήμα το οποίο εκτείνεται στην εξωκυττάρια περιοχή εμπεριέχει περιοχές γλυκοζυλίωσης, διατηρεί μια μικρή θηλιά κυστεΐνης (cys-loop) και φαίνεται να εμπλέκεται στην πρόσδεση των περισσοτέρων μορίων (βενζοδιαζεπίνες κ. α.). Τέλος, διακρίνεται και μια ενδοκυττάρια θηλιά με θέσεις (Ser, Thr, Tyr) οι οποίες μπορούν να φωσφορυλιωθούν από μια ποικιλία πρωτεϊνικών κινασών (π.χ. cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση) και να μεταβάλλουν τις ιδιότητες του υποδοχέα (Σχήμα **1.9**).



Σχήμα 1.9: Δομή του υποδοχέα GABA_A. Στα αριστερά φαίνεται μία υπομονάδα ενσωματωμένη σε λιπιδική διπλοστοιβάδα. Καθεμία από τις α-έλικες απεικονίζεται ως κύλινδρος, ενώ με κίτρινο χρώμα επισημαίνεται ο δισουλφιδικός δεσμός στη θηλιά κυστεΐνης. Στα δεξιά φαίνονται οι πέντε υπομονάδες διευθετημένες συμμετρικά γύρω από τον κεντρικό δίαυλο των ιόντων χλωρίου⁹¹.

Όπως γίνεται αντιληπτό, οι πέντε υπομονάδες μπορούν να συνδυασθούν με εκατοντάδες χιλιάδες τρόπους οι οποίοι οδηγούν σε πολυάριθμες ισομορφές του υποδοχέα GABA_A. Ωστόσο, ο αριθμός των δραστικών ισομορφών είναι αρκετά περιορισμένος⁹². Στην απλούστερη μορφή του, ο υποδοχέας GABA_A αποτελείται τουλάχιστον από δύο υπομονάδες *α* και δύο υπομονάδες *β*⁹³, αλλά ο πιο κοινός συνδυασμός των υπομονάδων στο 50% των φυσιολογικών GABA_A υποδοχέων σε ενήλικες είναι α162α162γ2⁹⁴. Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι μερικοί τύποι υπομονάδων απαντώνται σε συγκεκριμένα μόνο κύτταρα (π.χ. η α5 στα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου, η α6 στα παρεγκεφαλιδικά κοκκιώδη κύτταρα και η ρ1 στα αμφιβληστροειδικά διπολικά κύτταρα). Η δε υπομονάδα ε φαίνεται να μπορεί να συνυπάρχει σε υποδοχείς οι οποίοι περιέχουν α1, 63 και γ2 υπομονάδες, οπότε ο υποδοχέας περιέχει μέλη από τέσσερις οικογένειες. Η σύσταση των υπομονάδων καθορίζει τη συγγένεια του υποδοχέα με το φυσικό αγωνιστή, τις ιδιότητες του δίαυλου (αγωγιμότητα), τη φαρμακολογία του υποδοχέα, αλλά επίσης προσδιορίζει ενδοκυττάριους στόχους από διαφορετικές περιοχές⁹⁵. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό, αφού οι περισσότεροι νευρώνες εμφανίζουν πέραν του ενός τύπου GABA_A υποδοχέα.

1.7.3 Λειτουργία και φαρμακολογία των υποδοχέων GABA_A

Η κύρια λειτουργία του υποδοχέα GABA_A μέσω της ενεργοποίησής του από το γ-αμινοβουτυρικό οξύ είναι να αυξάνει τη διαπερατότητα των μετασυναπτικών μεμβρανών ως προς τα ιόντα χλωρίου. Αυτό έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την υπερπόλωση των νευρώνων και τελικά, την αναστολή της νευρικής ώσης και τη διάδοση του σήματος κατά μήκος των νευρώνων (νευροδιαβίβαση)^{96,97}.

Αναλυτικότερα, τα ιόντα χλωρίου βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον εξωκυττάριο χώρο των νευρώνων σε σύγκριση με το εσωτερικό τους, με αποτέλεσμα να τείνουν να κινηθούν προς τον ενδοκυττάριο χώρο. Όμως, από άποψη ηλεκτρικού δυναμικού και εξαιτίας της αρνητικής φόρτισης της κυτταροπλασματικής πλευράς της μεμβράνης τα ιόντα χλωρίου τείνουν να κινηθούν προς το εξωτερικό του κυττάρου. Με τη δέσμευση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στον GABA_A υποδοχέα σε νευρώνες οι οποίοι βρίσκονται σε δυναμικό ηρεμίας μεταβάλλεται η διαμόρφωση του πρωτεϊνικού αυτού υποδοχέα εντός της μεμβράνης και ανοίγει ο ιοντικός δίαυλος. Αυτό προκαλεί την εισροή ιόντων χλωρίου προς το κυτταρόπλασμα, λόγω μικρής υπεροχής του χημικού έναντι του ηλεκτρικού δυναμικού των ιόντων. Στους περισσσότερους νευρώνες, το δυναμικό ισορροπίας της κυτταρικής μεμβράνης για τα ανιόντα χλωρίου είναι παρόμοιο ή πιο αρνητικό από το δυναμικό ηρεμίας, με αποτέλεσμα η ενεργοποίηση των υποδοχέων

GABA_A να σταθεροποιεί ή αντίστοιχα να υπερπολώνει το δυναμικό ηρεμίας. Κατά αυτόν τον τρόπο, καθίσταται δύσκολη η αποπόλωση των νευρώνων από άλλους νευροδιαβιβαστές και η δημιουργία δυναμικού ενέργειας, μειώνοντας τη διεγερσιμότητα των νευρικών κυττάρων. Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης⁹⁸ ή σε μερικές περιπτώσεις, σε νευρώνες ενηλίκων ή σε γλοία υψηλότερες ενδοκυττάριες συγκεντρώσεις ιόντων χλωρίου από τις φυσιολογικές μπορούν να οδηγήσουν σε εκροή των ιόντων χλωρίου και αποπόλωση, οπότε παρατηρείται διέγερση των νευρώνων αντί αναστολής.

Διάφορες κατηγορίες φαρμάκων αλληλεπιδρούν σε διαφορετικές θέσεις των υποδοχέων GABAA και δρουν ως αγωνιστές ή ως ανταγωνιστές του γαμινοβουτυρικού οξέος (π.χ. μπικουκουλίνη ή μουσκιμόλη, αντίστοιχα)^{99,100}. Τα σπασμολυτικά, όπως η πικροτοξίνη, προσδένονται είτε στο δίαυλο είτε κοντά στο δίαυλο ιόντων χλωρίου. Στη θέση πρόσδεσης των βαρβιτουρικών συνδέονται π.χ. η φαινοβαρβιτάλη και η πεντοβαρβιτάλη οι οποίες αυξάνουν τη χρονική διάρκεια δράσης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος, παρατείνοντας το άνοιγμα του καναλιού. Χαρακτηριστικό είναι ότι μπορούν να προκαλέσουν τη διάνοιξη του καναλιού ιόντων χλωρίου ακόμη και απουσία του φυσικού αγωνιστή. Νευροστεροειδή, όπως τα 5α-παράγωγα της προγεστερόνης, με δράσεις παρόμοιες με αυτές των βαρβιτουρικών¹⁰¹ φαίνεται να δρουν σε διαφορετική περιοχή του υποδοχέα GABA_A από τα βαρβιτουρικά και τις βενζοδιαζεπίνες. Γενικότερα, τα νευροστεροειδή μπορούν να δράσουν ως θετικοί ή ως αρνητικοί αλλοστερικοί τροποποιητές των υποδοχέων GABAA σε διαφορετικούς πληθυσμούς νευρώνων και η δράση τους μπορεί να είναι κατασταλτική-υπνωτική, σπασμολυτική και αγχολυτική¹⁴. Η αιθανόλη^{102,103} δρα είτε έμμεσα μέσω φωσφορυλίωσης¹⁰⁴ είτε άμεσα, ενώ στη θέση πρόσδεσης των βενζοδιαζεπινών προσδένονται ποικιλόμορφοι θετικοί ή αρνητικοί τροποποιητές του υποδοχέα GABA_A.

Στο Σχήμα **1.10** απεικονίζεται η δομή του υποδοχέα GABA_A και οι θέσεις αλληλεπίδρασής του με τους αγωνιστές και ανταγωνιστές του γ-αμινοβουτυρικού οξέος. Η υπομονάδα α φέρει τη θέση δέσμευσης για βαρβιτουρικά και άλλα φάρμακα τα οποία επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ τα στεροειδή φαίνεται να συνδέονται στην β υπομονάδα. Στους πιο πολλούς υποδοχείς, το γαμινοβουτυρικό οξύ προσδένεται στην περιοχή επαφής των υπομονάδων α και β,

ενώ οι βενζοδιαζεπίνες προσδένονται στην περιοχή επαφής των υπομονάδων α και γ.



Σχήμα 1.10: Θέσεις αλληλεπίδρασης του υποδοχέα GABA_Aμε το γ-αμινοβουτυρικό οξύ και τους διάφορους τροποποιητές της δράσης του.

Πρόσφατα δημοσιεύθηκε από το εργαστήριό μας μια νέα σειρά αναλόγων αλλοπρεγνανολόνης τα οποία φέρουν στις θέσεις C17 και C20 πλευρικές αλυσίδες με περιορισμένους βαθμούς ελευθερίας (αλκυνυλο- και προπαδιενυλομάδα), προκειμένου να αντλήσουμε περισσότερες πληροφορίες για τη σχέση δομήςδραστικότητας των 5α-ανηγμένων στεροειδών τα οποία τροποποιούν τους υποδοχείς GABA_A. Οι ενώσεις αυτές βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τον υποδοχέα GABA_A, ενώ πολλά υποσχόμενο αναδείχθηκε το ανάλογο (20*R*)-17*θ*-(1υδροξυ-2,3-βουταδιενυλο)-5α-ανδροσταν-3-όλη το οποίο τροποποιεί τους παρεγκεφαλικούς υποδοχείς GABA_A σε συγκεντρώσεις της τάξης του nM¹⁰⁵.

1.7.4 Συσχέτιση φαρμακολογικών ιδιοτήτων των υποδοχέων GABA_A με τη σύσταση των υπομονάδων τους

Οι υποδοχείς GABA_A διακρίνονται σε συναπτικούς (εντός της περιοχής της σύναψης) και εξωσυναπτικούς (εκτός της περιοχής της σύναψης) οι οποίοι διαφέρουν ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά και τις βιοφυσικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Οι συναπτικοί υποδοχείς GABA_A είναι ετερο-τριμερή τα οποία σχεδόν πάντα περιέχουν την υπομονάδα γ2, υπομονάδα απαραίτητη για τη συγκρότηση των υποδοχέων και την παρουσία τους στη σύναψη¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Αντιθέτως, οι εξωσυναπτικοί υποδοχείς στα πριονωτά κοκκιώδη κύτταρα ιππόκαμπου (DGCs), στα κοκκιώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίτιδας (CGCs) και στους διαβιβαστικούς νευρώνες του θαλάμου αποτελούνται από τις υπομονάδες α4 ή α6 σε συνδυασμό με τις υπομονάδες β και δ. Παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για το γαμινοβουτυρικό οξύ και μειωμένη απευαισθητοποίηση στη συνεχή παρουσία του παραπάνω αγωνιστή, οπότε αυτοί οι υποδοχείς θεωρούνται ιδανικοί, αφού ενεργοποιούνται ακόμα και από τις χαμηλές συγκεντρώσεις του νευροδιαβιβαστή (περίπου 0.5-1μM) οι οποίες εκτιμάται ότι υπάρχουν εξωσυναπτικά¹⁰⁹. Παρόλα αυτά, σε πυραμιδικούς νευρώνες ιππόκαμπου CA1¹¹⁰ έχουν ταυτοποιηθεί εξωσυναπτικοί υποδοχείς με χαμηλότερη συγγένεια για το γ-αμινοβουτυρικό οξύ και με αυξημένη απευαισθητοποίηση, οι οποίοι δεν περιέχουν τη υπομονάδα δ (α563γ2) και των οποίων η ενεργοποίηση εξαρτάται από τη διαθέσιμη συγκεντρωση του νευροδιαβιβαστή (Σχήμα 1.11). Συνεπώς, οι ενδογενείς τροποποιητές του υποδοχέα GABAA, όπως τα νευροστεροειδή, μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη σύσταση των υπομονάδων του, αυξάνοντας ταυτόχρονα τη συγγένεια του για το γαμινοβουτυρικό οξύ¹¹¹.



Σχήμα 1.11: Σύσταση υπομονάδων σε συναπτικούς και εξωσυναπτικούς υποδοχείς GABA_A στα πυραμιδικά κύτταρα CA1¹¹².

Η επίδραση κάποιων θετικών αλλοστερικών τροποποιητών του υποδοχέα GABA_A εξαρτώνται σε υψηλό βαθμό από τη σύσταση των υπομονάδων του. Για παράδειγμα, η ισομορφή της *θ* υπομονάδας επηρεάζει την ενίσχυση των GABAπροκαλούμενων αποκρίσεων από το αναισθητικό ετομιδάτη¹¹³, ενώ οι ισομορφές των *α* και *γ* υπομονάδων επηρεάζουν τη φαρμακολογία των βενζοδιαζεπινών στον υποδοχέα GABA_A.

Στο Σχήμα **1.12** επισημαίνονται οι θέσεις αλληλεπίδρασης κάποιων φαρμάκων στους υποδοχείς GABA_A.



Σχήμα 1.12: Ο υποδοχέας GABA_A και φάρμακα με τα οποία αλληλεπιδρά.

Αντιθέτως, η σύσταση των υπομονάδων του υποδοχέα φαίνεται να επηρεάζει σε περιορισμένο βαθμό την ευαισθησία του υποδοχέα ως προς την αλλοπρεγνανολόνη. Οι διαφορές στην ευαισθησία των στεροειδών μπορεί να είναι σημαντικές, αν ληφθούν υπόψη τα φυσιολογικά επίπεδα της αλλοπρεγνανολόνης. Τα συναπτικά επίπεδα αυτού του στεροειδούς δεν είναι ακριβώς γνωστά. Στο πλάσμα, όμως, κυμαίνονται μεταξύ 3-10 nM, αυξάνονται σε 30-60 nM μετά από ήπιο στρες και περίπου σε 100 nM πριν τον τοκετό. GABA-προκαλούμενες αποκρίσεις οι οποίες γίνονται μέσω α161γ2 και α361γ2 υποδοχέων ενισχύονται από σχετικά μικρές συγκεντρώσεις (≥3 nM) της αλλοπρεγνανολόνης, ενώ ισοδύναμοι υποδοχείς οι οποίοι συνδυάζουν τις υπομονάδες α2, α4, α5 ή α6 απαιτούν τρεις με δέκα φορές μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Υποδοχείς οι οποίοι περιέχουν τη γ1 υπομονάδα είναι λιγότερο ευαίσθητοι στην αλλοπρεγνανολόνη σε σύγκριση με υποδοχείς οι οποίοι περιέχουν τη γ2 ή τη γ3 υπομονάδα¹¹⁴.

Συμπληρωματικά, υποδοχείς οι οποίοι περιέχουν τη δ υπομονάδα σε συνδυασμό με τις υπομονάδες α4 και α1 είναι πολύ ευαίσθητοι ως προς τις αλλοπρεγνανολόνη και 3α,5α-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνη¹¹⁴⁻¹¹⁶ και παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, το οποίο δρα ως

μερικώς αγωνιστής και με χαμηλή αποτελεσματικότητα¹¹⁷. Συνεπώς, υποδοχείς GABA_A οι οποίοι περιέχουν τη δ υπομονάδα εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία ως προς τα νευροστεροειδή. Τα παραπάνω συμφωνούν με πειραματικά δεδομένα για εξωσυναπτικούς υποδοχείς με ενσωματωμένη υπομονάδα δ¹¹⁸⁻¹²⁰.

Η σύσταση των υπομονάδων των υποδοχέων GABA_A δεν μπορεί να εξηγήσει πλήρως την ευαισθησία των εξωσυναπτικών υποδοχέων ως προς τα νευροστεροειδή στα διάφορα είδη νευρώνων. Εντούτοις, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις νευροστεροειδών, σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις (π.χ. εγκυμοσύνη ή οξύ στρες, αντίστοιχα), προκαλεί αλλαγές στη σύσταση των υποδοχέων GABA_A σε γονιδιακό επίπεδο. Τέτοιες γονιδιακές μετατροπές στην έκφραση των υπομονάδων συνοδεύονται από αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων *in vivo* και *in vitro*¹²¹⁻¹²⁵ και πιθανόν να συμβάλλουν στην εύρεση κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης¹²⁶.

1.7.5 Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση των συναπτικών υποδοχέων GABA_A φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών με τους υποδοχείς. Για παράδειγμα, η αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) μειώνει την ευαισθησία των συναπτικών υποδοχέων GABA_A ως προς τα νευροστεροειδή σε νευρώνες ιππόκαμπου CA1¹²⁷ και στα κύτταρα ιππόκαμπου DGC, ενώ την αυξάνει στους μεγαλοκυτταρικούς ωκυτοκινικούς νευρώνες του υπεροπτικού πυρήνα του υποθαλάμου στα τελευταία στάδια της εγκυμοσύνης¹²⁸. Μετά τον τοκετό, αναστολή της κινάσης ή διέγερση της φωσφατάσης αποκαθιστά την ευαισθησία των συναπτικών υποδοχέων GABA_A ως προς τα νευροστεροειδή¹²⁸.

Γενικότερα, τα αποτελέσματα της φωσφορυλίωσης στη λειτουργία των υποδοχέων GABA_A είναι πολύπλοκα. Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτώνται είναι η ισομορφή της κινάσης η οποία εμπλέκεται, η σύσταση των υπομονάδων του υποδοχέα και το είδος των αμινοξέων των υπομονάδων τα οποία φωσφορυλιώνονται^{117,129,130}. Οι δε μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η φωσφορυλίωση επηρεάζει την ευαισθησία των συναπτικών υποδοχέων ως προς τα

νευροστεροειδή δεν έχουν ακόμα εξιχνιασθεί. Σε μερικές περιπτώσεις, ο στόχος της φωσφορυλίωσης μπορεί να μην είναι ο υποδοχέας, αλλά περισσότερες από μία πρωτεΐνες οι οποίες συσχετίζονται με τον υποδοχέα^{130,131}. Επιπλέον, δεν είναι σαφές αν η φωσφορυλίωση επηρεάζει άμεσα την πρόσδεση των νευροστεροειδών με τον υποδοχέα ή εναλλακτικά επιδρά στην επαγόμενη από τα νευροστεροειδή κινητική του ιοντικού διαύλου. Όσον αφορά στις ισομορφές της κινάσης και της φωσφατάσης, δεν είναι γνωστό ποιές από αυτές επιδρούν στην ευαισθησία του υποδοχέα ως προς τα νευροστεροειδή¹³². Ωστόσο, πρόσφατες ενδείξεις υποδεικνύουν τη μεσολάβηση της ισομορφής PKC_ε¹²⁶. Ειδικότερα, σε ποντίκια των οποίων το γονιδίωμα δεν περιέχει το γονίδιο της ισομορφής PKC_ε οι υποδοχείς GABA_A παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε έναν αριθμό θετικών αλλοστερικών τροποποιητών, ανάμεσα στους οποίους και τα νευροστεροειδή¹³³.

1.7.6 Ρύθμιση των υποδοχέων GABAA από τα νευροστεροειδή

1.7.6.1 Συναπτικοί υποδοχείς GABA_A

Οι συναπτικοί υποδοχείς διακρίνονται σε προσυναπτικούς και μετασυναπτικούς.

Προσυναπτικοί υποδοχείς. Ορισμένοι νευρώνες εκφράζουν αυτοϋποδοχείς GABA_A οι οποίοι ρυθμίζουν την έκκριση νευροδιαβιβαστών σε συνάρτηση με τη συχνότητα εμφάνισης των μετασυναπτικών ρευμάτων¹³⁴⁻¹³⁷. Η ενίσχυση των προσυναπτικών υποδοχέων GABA_A από τα νευροστεροειδή αναμένεται να διευκολύνει την αναστολή των αξονικών άκρων των νευρώνων και άρα, να μειώνει την απελευθέρωση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος. Παρόλα αυτά, σε μια σειρά μελετών σε διάφορα είδη νευρώνων η αλλοπρεγνανολόνη όλως παραδόξως αυξάνει τη συχνότητα των (ανεξάρτητων από το δυναμικό ενέργειας) ανασταλτικών μετασυναπτικών ρευμάτων/δυναμικών (sIPSC/sIPSPs και mIPSC/mIPSPs)¹³². Λεπτομερής διερεύνηση αυτού του μηχανισμού των νευροστεροειδών σε πλάγιους προοπτικούς νευρώνες διασαφήνισε ότι αυτό το φαινόμενο οφείλεται στην ανάπτυξη εντοπισμένου διαμεμβρανικού δυναμικού από την παρουσία ιόντων χλωρίου στα αξονικά άκρα των προσυναπτικών νευρώνων^{138,139}. Η ενεργοποίηση των προσυναπτικών υποδοχέων GABA_A από τα νευροστεροειδή στα αξονικά άκρα

των νευρώνων οδηγεί σε εκροή ιόντων χλωρίου από τους νευρώνες και επομένως, σε εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Διαδοχικά, ενεργοποιούνται οι δίαυλοι ιόντων ασβεστίου και επέρχεται αύξηση της συχνότητας απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή, διαδικασία η οποία πιστεύεται ότι ακολουθείται και στη διεγερτική δράση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος σε μη ώριμους νευρώνες¹⁴⁰.

Μετασυναπτικοί υποδοχείς. Αρχικές μελέτες αποκάλυψαν ότι χαμηλές συγκαντρώσεις (της τάξης των nM) νευροστεροειδών παρατείνουν το χρόνο κατά τον οποίο το κανάλι ιόντων χλωρίου παραμένει ανοιχτό, χωρίς να επιδρούν στην αγωγιμότητά του¹⁴¹⁻¹⁴³. Επίσης, σε συγκεντρώσεις \geq 100 nM τα νευροστεροειδή ενεργοποιούν άμεσα τους υποδοχείς GABA_A^{142,144} και προάγουν την παρατεταμένη διάνοιξη των ιοντικών καναλιών επί μακρόν ή ανά διαστήματα¹⁴⁵.

Η επίδραση των ενδογενών και συνθετικών νευροστεροειδών στην ανασταλτική νευροδιαβίβαση έχει εξετασθεί σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (νευρώνες ιππόκαμπου, υποθαλάμου, θαλάμου, παρεγκεφαλίδας, αμυγδαλής, νωτιαίου μυελού και φλοιού του εγκεφάλου)^{111,118,126,127,146-152} και υπάρχει ομοφωνία ως προς την παρατήρηση ότι τα νευροστεροειδή παρατείνουν το ρεύμα IPSC. Φυσικά, σε διαφορετικούς νευρώνες αντιστοιχεί και διαφορετική συγκέντρωση νευροστεροειδούς η οποία απαιτείται για να επιφέρει το ίδιο αποτέλεσμα, γεγονός το οποίο παρατηρείται ακόμα και σε νευρώνες της ίδιας περιοχής του εγκεφάλου^{118,127}.

Θα πρέπει να έχουμε υπόψη ότι η ευαισθησία των συναπτικών υποδοχέων GABA_A στα νευροστεροειδή μεταβάλλεται σε συνάρτηση διαφόρων φυσιολογικών, παθοφυσιολογικών ή επαγόμενων από φάρμακα παραμέτρων, εφιστώντας την προσοχή και το ενδιαφέρον μας στην περαιτέρω εξέταση και κατανόηση των μηχανισμών οι οποίοι διέπουν αυτή την αλληλεπίδραση.

1.7.6.2 Εξωσυναπτικοί υποδοχείς GABA_A

Σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου, οι υποδοχείς, περισυναπτικοί και εξωσυναπτικοί, οι οποίοι συμμετέχουν στην τονική ανασταλτική απόκριση εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία στα νευροστεροειδή σχετικά με τους αντίστοιχους συναπτικούς υποδοχείς. Παραδειγματικά αναφέρεται ότι η τονική

αγωγιμότητα σε κύτταρα DGCs και CGCs ενήλικου ποντικού ενισχύεται από χαμηλές συγκεντρώσεις (10 nM) 3α,5α-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνης, η οποία ωστόσο δεν επιδρά στην κινητική των συναπτικών ρευμάτων των ίδιων νευρώνων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι αύξηση κατά δέκα φορές της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου στεροειδούς επιδρά ελάχιστα ή και καθόλου στα ρεύματα mIPSCs τα οποία εμφανίζονται σε αυτούς τους νευρώνες. Και στις δύο περιπτώσεις νευρικών κυττάρων, είναι χαρακτηριστικό ότι οι υποδοχείς GABAA περιέχουν την υπομονάδα δ¹²⁰ και παρουσιάζουν υψηλότερη απόκριση στα νευροστεροειδή συγκριτικά με υποδοχείς οι οποίοι περιέχουν την υπομονάδα γ¹¹⁴⁻ ^{116,153}. Πρόσφατα ευρήματα συνηγορούν ότι η φύση της αλληλεπίδρασης των νευροστεροειδών με υποδοχείς GABA_A με υπομονάδες δ (π.χ. α462 δ) εξαρτάται από το είδος των υπόλοιπων υπομονάδων, αλλά και από την κατεύθυνση ροής των ιόντων χλωρίου¹⁵⁴. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να έχει φυσιολογική σημασία, αφού η κατεύθυνση της ροής των ιόντων χλωρίου μεταβάλλεται από νευρώνα σε νευρώνα και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Μελέτες με ανασυνδυασμένους και φυσιολογικούς υποδοχείς σε συνδυασμό με πειράματα συμπεριφοράς επιβεβαιώνουν την εκλεκτική αλληλεπίδραση νευροστεροειδών και υποδοχέων με υπομονάδες δ.

Όσον αφορά στην τονική ανασταλτική απόκριση των εξωσυναπτικών υποδοχέων στα νευροστεροειδή σε νευρώνες ιππόκαμπου CA1, η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη. Συνήθως, οι υποδοχείς αυτοί περιέχουν υπομονάδες δ ή συνδυασμό των υπομονάδων αβ ή η σύσταση των υπομονάδων τους είναι α5βγ2. Οι τελευταίοι υποδοχείς διαφέρουν ως προς τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες από τους υποδοχείς με υπομονάδες δ: εκδηλώνουν χαμηλή απόκριση στο φυσικό αγωνιστή και στο THIP (υπνωτικό και καταπραϋντικό φάρμακο το οποίο δρα ως εκλεκτικός αγωνιστής υποδοχέων με συνδυασμούς υπομονάδων αβ και αβδ), αλλά η απόκρισή τους στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ ενισχύεται από βενζοδιαζεπίνες, όπως η μιδαζολάμη και η διαζεπάμη^{110,155-157}. Απουσία της α5 ισομορφής από τους νευρώνες CA1 ποντικού συνεπάγεται μείωση της τονικής αγωγιμότητας (tonic conductance) (υπό συνθήκες αυξημένων επιπέδων γ-αμινοβουτυρικού οξέος με τη χορήγηση βιγαμπατρίνης)¹¹⁰, ενώ η έκφραση των υπομονάδων *α*4 και δ στα ίδια κύτταρα φαίνεται να ρυθμίζεται από την ανάπτυξη¹⁵⁴.

Συμπερασματικά, στις ανασταλτικές συνάψεις, ένα σύνολο κοινών παραγόντων (φωσφορυλίωση υποδοχέα, μεταβολισμός νευροστεροειδών, ισομορφή υπομονάδων, συγκέντρωση νευροδιαβιβαστή, συγγένεια υποδοχέα για φυσικό αγωνιστή, αποτελεσματικότητα γ-αμινοβουτυρικού οξέος, κατανομή των νευροστεροειδών στον εγκέφαλο) φαίνεται ότι συμβάλλει στην ετερογένεια της στεροειδικής δράσης τόσο στους συναπτικούς, όσο και στους εξωσυναπτικούς υποδοχείς GABA_A¹³².

Το Σχήμα **1.13** απεικονίζει τη ρύθμιση των συναπτικών και εξωσυναπτικών υποδοχέων GABA_A από τη δράση των νευροστεροειδών.



Σχήμα 1.13: Ρύθμιση της ανασταλτικής νευροδιαβίβασης από τα νευροστεροειδή².

1.7.7 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των νευροστεροειδών με τους υποδοχείς GABA_A

Τα ενδογενή νευροστεροειδή και τα συνθετικά τους ανάλογα θεωρούνται από τους πιο ισχυρούς και αποτελεσματικούς (θετικούς ή αρνητικούς) τροποποιητές του υποδοχέα GABA_A². Εντούτοις, πολλά ουσιαστικά ερωτήματα σχετικά με τη δράση των νευροστεροειδών παραμένουν αναπάντητα, όπως πώς, πού και σε ποιές συγκεντρώσεις εκδηλώνουν τη δράση τους στους υποδοχείςστόχους.

Τα προτεινόμενα μοντέλα για την εξήγηση της δράσης των νευροστεροειδών στον υποδοχέα GABA_A είναι τα εξής:

1. Τα νευροστεροειδή αλληλεπιδρούν έμμεσα με τον υποδοχέα. Η υπόθεση της έμμεσης αλληλεπίδρασης στηρίζεται στην ιδιότητα των στεροειδών να ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή. Άρα, η γονιδιακή ρύθμιση μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πιθανός έμμεσος μηχανισμός τροποποίησης της λειτουργίας του υποδοχέα, ειδικότερα εάν ληφθεί υπόψη ότι τα νευροστεροειδή ρυθμίζουν τη μεταγραφή των υπομονάδων του υποδοχέα GABA_A και επομένως, μπορούν να τροποποιήσουν την αναστολή για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα¹⁵⁸. Επιπλέον, τα νευροστεροειδή μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεϊνικές κινάσες ή φωσφατάσες, των οποίων η μετα-μεταφραστική ρύθμιση επίσης τροποποιεί τη λειτουργία του υποδοχέα GABA_A². Ωστόσο, σε μερικά συστήματα είναι καθοριστικός ο ρόλος της άμεσης φωσφορυλίωσης του υποδοχέα όσον αφορά στην ευαισθησία του ως προς τα νευροστεροειδή¹²⁶, οπότε το μοντέλο της άμεσης αλληλεπίδρασης των νευροστεροειδών με τον εξεταζόμενο υποδοχέα αναδεικνύεται πιθανότερο.

2. Τα νευροστεροειδή αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποδοχέα είτε συνδεόμενα σε ειδική θέση πρόσδεσης, με την οποία παρουσιάζουν σχέση "κλειδιού-κλειδαριάς" και η οποία βρίσκεται σε υδατική δομική περιοχή του υποδοχέα (παρόμοια με αυτή όπου γίνεται πρόσδεση των βενζοδιαζεπινών και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος), είτε μέσω μιας υδατικά προσβάσιμης διαμεμβρανικής δομικής περιοχής. Υπάρχει μια κατηγορία νευροστεροειδών, ανάμεσά τους και η αλλοπρεγνανολόνη, τα οποία διαθέτουν αναισθητικές ιδιότητες όταν χορηγούνται εξωγενώς σε υψηλές συγκεντρώσεις. Έχει αποδειχθεί ότι απαραίτητα δομικά στοιχεία για την εκδήλωση ανάλογης δράσης είναι η παρουσία του 3α-υποκαταστάτη στον Α δακτύλιο, ο οποίος μπορεί να δράσει ως δότης σε δεσμό υδρογόνου, και η παρουσία του C20 καρβονυλίου του 17β-υποκαταστάτη του στεροειδούς, ο οποίος μπορεί να δράσει ως δέκτης σε δεσμό υδρογόνου.¹⁵⁹. Κατά συνέπεια, η επίδραση των νευροστεροειδών στη λειτουργία του υποδοχέα GABA_A είναι εναντιοεκλεκτική¹⁶⁰⁻¹⁶³, γεγονός το οποίο προϋποθέτει μηχανισμό δράσης

μέσω πρωτεϊνικής, χειρόμορφης θέσης πρόσδεσης. Επιπρόσθετα, η χειρομορφία των πρωτεϊνικών υποδοχέων επάγεται ότι η απόλυτη διαμόρφωση του προσδέτη επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις με τις θέσεις πρόσδεσής του^{164,165}.

Η πιθανότητα ύπαρξης θέσης πρόσδεσης στον υποδοχέα GABA_A για τα νευροστεροειδή ενισχύεται από την κρίσιμη σημασία των υπομονάδων α και β για τα νευροστεροειδή^{166,167}. Ειδικότερα, ορισμένα κατάλοιπα αμινοξέων στις διαμεμβρανικές περιοχές της α υπομονάδας είναι δυνατόν να σχηματίζουν την υποθετική υδροφοβική κοιλότητα όπου προσδένονται τα νευροστεροειδή και αυξάνουν τη δράση του υποδοχέα παρουσία του φυσικού αγωνιστή. Ενώ η ύπαρξη δύο υπομονάδων α υπονοεί ότι ο υποδοχέας πιθανόν διαθέτει δύο θέσεις πρόσδεσης για τα νευροστεροειδή, μελέτες παρέχουν ενδείξεις για μία μόνο λειτουργική θέση πρόσδεσης η οποία μπορεί να επάγει σχεδόν πλήρη ενίσχυση^{168,169}. Αυτό σε συνδυασμό με τις εξειδικευμένες ιδιότητες των εναντιομερών νευροστεροειδών μπορεί να αποτελούν ισχυρά επιχειρήματα υπέρ της ανάπτυξης εκλεκτικών αλληλεπιδράσεων των νευροστεροειδών με ειδικές θέσεις του υποδοχέα GABA_A.

3. Τα νευροστεροειδή αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα μέσω κάποιας δομικής περιοχής του η οποία είναι προσβάσιμη μέσω πλευρικής μεμβρανικής διάχυσης, η οποία διαφέρει από την ορμονική διάχυση¹⁷⁰. Έξι ενδεικτικά στοιχεία συνηγορούν υπέρ της θεωρίας αυτής¹⁷¹⁻¹⁷³:

 Η μη-εξειδικευμένη συσσώρευση και κατανομή φθοριζόντων αναλόγων νευροστεροειδών σε κυτταρικές μεμβράνες συνοδεύονται από ενεργοποίηση του υποδοχέα GABA_A και συνδέονται χρονικά με διάφορα βιολογικά φαινόμενα.

 Οι ιοντικοί δίαυλοι τμημάτων κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι απομονώνονται μετά από άμεση έκθεση σε υδατικά διαλύματα νευροστεροειδών τροποιούνται από τα νευροστεροειδή.

 Η ενίσχυση σε τμήματα διεγερμένων μεμβρανών εξακολουθεί ακόμα και μετά την απομάκρυνση υδατικών διαλυμάτων των νευροστεροειδών.

Τα νευροστεροειδή τα οποία δε διαπερνούν τη μεμβράνη ενεργοποιούν τον υποδοχέα GABA_A, μόνο όταν χορηγούνται στην ενδοκυττάρια πλευρά της μεμβράνης.

 Τα νευροστεροειδή τα οποία χορηγούνται απευθείας στον ενδοκυττάριο χώρο ενεργοποιούν τον υποδοχέα GABA_A.

Η αντισταθμιστική κινητική της ενεργοποίησης του υποδοχέα GABA_A από τα νευροστεροειδή, μετά την απομάκρυνση υδατικού διαλύματος του προσδέτη, επιταχύνεται δραματικά από εξωκυττάριες ενώσεις, οι οποίες δεσμεύουν τα ελεύθερα νευροστεροειδή¹⁷⁴. Άρα, τα νευροστεροειδή δεν προσδένονται σε μια συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης η οποία δε θα επέτρεπε την προσβασιμότητα από τις ενώσεις δέσμευσής τους, αλλά ταχέως αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα και αποσυνδέονται από αυτόν εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, καθιστώντας την κατανομή των νευροστεροειδών στην κυτταρική μεμβράνη καθοριστικό βήμα για την τροποποίηση του υποδοχέα GABA_A.

Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι αυτή η μη κλασική αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών με τον υποδοχέα GABA_A θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και στον τρόπο σχεδίασης των φαρμάκων στο μέλλον. Ως χαρακτηριστικά παραδείγματα ενώσεων με ανάλογο τρόπο δράσης αναφέρονται ο θειϊκός εστέρας της πρεγνενολόνης και η κεταμίνη τα οποία πιθανότατα αλληλεπιδρούν με υποδοχείς ακολουθώντας μια διαμεμβρανική πορεία^{175,176}, η αιθανόλη η οποία αλληλεπιδρά με διάφορους πρωτεϊνικούς στόχους μέσω διαμεμβρανικής πρόσβασης¹⁷⁷, τα λιπόφιλα κανναβινοειδή τα οποία κατανέμονται στην κυτταρική μεμβράνη πριν αλληλεπιδράσουν με τους υποδοχείς τους¹⁷⁸, όπως επίσης οι τοξίνες και τα νευροδραστικά πεπτίδια τα οποία δρουν σε κανάλια καλίου και μηχανοευαίσθητα κανάλια, αντίστοιχα^{179,180}.

1.7.8 Σχέση δομής-δραστικότητας στεροειδών ρυθμιστών των υποδοχέων GABAA

Ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα και τεχνικές πρόσδεσης με επισημασμένα μόρια ανέδειξαν τα πρώτα δομικά κριτήρια τα οποία πρέπει να πληρούν τα νευροστεροειδή για την εμφάνιση αγωνιστικής δράσης στον υποδοχέα GABA_A. Αναλυτικότερα, τα 5α/β-πρεγνάνια ή ανδροστάνια τα οποία φέρουν 3αυδροξυλομάδα και κετο-ομάδα στη θέση C20 του πρεγνανίου ή στη θέση C17 του ανδροστανίου, αντίστοιχα, αποτελούν αγωνιστές του συγκεκριμένου υποδοχέα, με τα ανάλογα 3α-υδροξυ-5α/β-πρεγναν-20-όνη και 3α,21-διϋδροξυ-5α-πρεγναν-20-

όνη να χαρακτηρίζονται ως πρότυπα από αυτή την άποψη. Εντούτοις, νεότερες μελέτες της σχέσης δομής-δραστικότητας απέδειξαν ότι μπορούν να υπάρξουν εξαιρέσεις σε αυτά τα αυστηρά κριτήρια, οι σηματικότερες από τις οποίες συνοψίζονται παρακάτω¹⁸¹:

α) Η αναγωγή της 20-κετο-ομάδας δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την αγωνιστική δράση, δεδομένου ότι προϊόντα αναγωγής του 20-καρβονυλίου δρουν ως μερικοί αγωνιστές. Η δραστικότητα και η αποτελεσματικότητα τέτοιων αναλόγων εξαρτάται από συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά, όπως η 5α ή 56 διάταξη και η απεικόνιση της 20-υδροξυλομάδας.

β) Ο κορεσμένος Α δακτύλιος δεν είναι πλέον απαιτούμενη προϋπόθεση για την εμφάνιση αγωνιστικής δράσης, αφού το ανάλογο 3α-υδροξυ-4-πρεγνεν-20-όνη έχει παρόμοια δραστικότητα με το ανάλογο 3α-υδροξυ-5α-πρεγναν-20-όνη σε διάφορα πειράματα. Επιπλέον, ο δακτύλιος Α του στεροειδικού σκελετού per se δεν είναι απαραίτητος για την εκδήλωση δράσης, αν λάβουμε υπόψη τη δραστικότητα των αναλόγων βενζ[e]ινδενο-3(R)-καρβονιτρίλια^{161,182}.

1.8 Υποδοχείς NMDA

Οι υποδοχείς ΝΜDΑ ανήκουν στην κατηγορία των ιονοτρόπων γλουταμινεργικών διαμεμβρανικών υποδοχέων. Σε μοριακό επίπεδο, αποτελούν τον κύριο μηχανισμό ελέγχου της συναπτικής πλαστικότητας και συνεπώς, της λειτουργίας της μάθησης και της μνήμης¹⁸³. Το *N*-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τους συγκεκριμένους υποδοχείς, τους οποίους και ενεργοποιεί ως φυσικός αγωνιστής. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η διάνοιξη ενός ιοντικού κατιοντικού διαύλου ο οποίος επιτρέπει την εισροή ιόντων νατρίου, ασβεστίου και καλίου στον κυτταροπλασματικό χώρο. Επίσης, οι υποδοχείς NMDA διαφέρουν από τους υπόλοιπους ως προς το γεγονός ότι η ενεργοποίησή τους προϋποθέτει τη δέσμευση δύο επιπλέον συν-αγωνιστών: του γλουταμικού οξέος και της γλυκίνης.

Ο υποδοχέας NMDA επίμυος είναι ένα ετερο-τετραμερές το οποίο συνίσταται από δύο υπομονάδες NR1 (απαραίτητα συστατικές μονάδες που καθορίζουν τις ιδιότητες του καναλιού)¹⁸⁴ και δύο υπομονάδες NR2 (εντοπίζονται

σε ορισμένες περιοχές). Η ύπαρξη μιας τρίτης υπομονάδας NR3 πιστεύεται ότι συμβάλλει στην αναστολή του υποδοχέα. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα **1.14**, ο υποδοχέας NMDA διαθέτει: α) την εξωκυττάρια δομική περιοχή, η οποία φέρει τις θέσεις τροποποίησης και την περιοχή πρόσδεσης των προσδετών (στις υπομονάδες NR1 προσδένεται η γλυκίνη και στις υπομονάδες NR2 το γλουταμικό οξύ), β) την περιοχή η οποία περιέχει τη θέση πρόσδεσης του αγωνιστή, γ) τη μεμβρανική δομική περιοχή, η οποία δομεί το κανάλι και είναι υπεύθυνη για την αγωγιμότητά του, τη διαπερατότητά από τα ιόντα ασβεστίου και την τασο-εξαρτώμενη φραγή του από τα ιόντα μαγνησίου και δ) την κυτταροπλασματική δομική περιοχή, η οποία διανίου και δ



Σχήμα 1.14: Δομή των υποδοχέων NMDA και θέσεις αλληλεπίδρασης με αγωνιστές και ανταγωνιστές τους.

Η ενεργοποίηση των υποδοχέων ΝΜDΑ παράγει το διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (EPSP) το οποίο οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου. Όμως, υπό φυσιολογικές συνθήκες οι δίαυλοι των υποδοχέων NMDA αναστέλλονται από ιόντα μαγνησίου και διανοίγονται μέσω εκπόλωσης του μετασυναπτικού κυττάρου¹⁸⁶.

Οι υποδοχείς NMDA μπορούν να τροποποιηθούν από έναν μεγάλο αριθμό ενδογενών και εξωγενών ενώσεων οι οποίες διαδραματίζουν "ρόλο-κλειδί" σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Ανάμεσα στους σημαντικότερους θετικούς και αρνητικούς αλλοστερικούς τροποποιητές τους συγκαταλέγονται τα νευροστεροειδή και η αιθανόλη¹⁴. Η τελευταία είναι μία από τις φαρμακολογικές ενώσεις η οποία προάγει αλλαγές στη σύσταση των υπομονάδων των υποδοχέων NMDA, αφού χρόνια χορήγηση αιθανόλης αυξάνει την έκφραση των εν λόγω υποδοχέων *in vitro* και *in vivo*¹⁸⁷. Όσον αφορά στα νευροστεροειδή, η αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς NMDA δεν έχει διερευνηθεί διεξοδικά και δεν έχουν περιγραφεί συγκεκριμένες θέσεις αλληλεπίδρασης. Όμως, σε πρωτογενή καλλιέργεια εμβρυϊκών νεοφλοιϊκών νευρώνων μυός, η δεϋδροεπιανδροστερόνη προκαλεί αύξηση στο ελεύθερο ενδοκυττάριο ασβέστιο απουσία χλωριούχου καλίου ή *N*-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος⁷⁵. Ο δε θειϊκός εστέρας της δεϋδροεπιανδροστερόνης ενισχύει την αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου η οποία επάγεται από το γλουταμικό οξύ και το *N*-μεθυλο-D-ασπαρτικό δράση της θειϊκής πρεγνανολόνης και της δεϋδροεπιανδροστερόνης στη ενίσχυση της μνήμης σε επίμυες, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ρύθμισης των υποδοχέων NMDA¹⁸⁹.

1.9 Υποδοχείς σ

Οι σ υποδοχείς (Σχήμα **1.15**) είναι πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη και η φυσιολογική λειτουργία τους δεν είναι ακόμα γνωστή¹⁴. Μελέτες πρόσδεσης με ραδιενεργό προσδέτη αποκάλυψαν την ύπαρξη τουλάχιστον τριών ειδών σ υποδοχέων: σ₁, σ₂ και σ₃. Πρόσφατα, κλωνοποιήθηκε από ηπατικό μικρόσωμα ινδικού χοιριδίου μια πρωτεΐνη με το προσδετικό προφίλ (binding profile) του σ₁ υποδοχέα¹⁹⁰.

Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος δομικά διαφορετικών αναλόγων τα οποία προσδένονται με τους σ υποδοχείς. Όμως, οι διάφορες ισομορφές των υποδοχέων δεν εκδηλώνουν σαφή εκλεκτικότητα για τους διάφορους προσδέτες τους. Νευροστεροειδή, όπως η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός της εστέρας, επάγουν την έκκριση νορεπινεφρίνης, μέσω *Ν*-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος, με ενεργοποίηση του σ₁ υποδοχέα σε δείγματα από ιππόκαμπο¹⁹¹. Αυτό υποδηλώνει ότι τα νευροστεροειδή τα οποία δρουν ως αγωνιστές των NMDA υποδοχέων μπορεί να είναι ενδογενείς προσδέτες για τους σ υποδοχείς. Πολλές μελέτες έχουν

αναφέρει ότι η επίδραση του θειϊκού εστέρα της δεϋδροεπιανδροστερόνης στη βελτίωση της μνήμης σχετίζεται με τη φαρμακολογική δράση της στους σ υποδοχείς¹⁴.



Σχήμα 1.15: Απεικόνιση της δομής των σ υποδοχέων.

1.10 Υποδοχείς 5-ΗΤ3

Οι υποδοχείς 5-ΗΤ₃ είναι ιονοτρόποι υποδοχείς και μέλη της υπεροικογένειας των ιοντικών καναλιών. Πρόκειται για υποδοχείς οι οποίοι είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες, διαφέρουν σημαντικά ως προς τη δομή και το μηχανισμό δράσης από τους υπόλοιπους υποδοχείς σεροτονίνης, ενώ σχετίζονται ως προς την ομολογία των αμινοξέων με τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

Αποτελούνται από πέντε υπομονάδες, ψευδοσυμμετρικά παρατεταγμένες περιφερειακά ενός κεντρικού ιοντικού πόρου, διαπερατού από ιόντα νατρίου, καλίου και ασβεστίου. Πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή σεροτονίνη στους υποδοχείς προκαλεί διάνοιξη του ιοντικού διαύλου ο οποίος ακολούθως, επιφέρει διέγερση των νευρώνων. Οι υποδοχείς σεροτινίνης εκφράζονται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και διαμεσολαβούν σε μια ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών¹⁹². Σε κυτταρικό επίπεδο, οι μετασυναπτικοί υποδοχείς σεροτονίνης επάγουν ταχέως τη διεγερτική συναπτική διαβίβαση¹⁹³, ενώ απαντώνται και σε προσυναπτικές νευρικές απολήξεις όπου πιθανολογείται ότι επάγουν ή ρυθμίζουν

την έκκριση νευροδιαβιβαστών¹⁹⁴. Η σεροτονίνη και το PBG ασκούν αγωνιστική δράση στους υποδοχείς 5-HT₃, ενώ τα νευροστεροειδή και η αιθανόλη συμπεριλαμβάνονται στους ανταγωνιστές τους (Σχήμα **1.16**).



Σχήμα 1.16: Απεικόνιση της δομής των υποδοχέων 5-ΗΤ₃¹⁹⁵.

Πειράματα καταγραφής δυναμικού σε ολόκληρα κύτταρα HEK 293 τα οποία εκφράζουν υποδοχείς 5-HT₃ κατέδειξαν την ανταγωνιστική ρύθμιση των τελευταίων από τα γονιδιακά στεροειδή 3,17*6*-οιστραδιόλη και προγεστερόνη¹⁹⁶. Ανταγωνιστικές ιδιότητες για αυτόν τον δίαυλο ιόντων εμφανίζουν και η 3,17*α*οιστραδιόλη, η 17*α*-αιθυνυλο-3,17*6*-οιστραδιόλη, η μεστρανόλη, η τεστοστερόνη και η αλλοπρεγνανολόνη, σε αντίθεση με το θειϊκό εστέρα της προγεστερόνης και τη χοληστερόλη.

Η αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών στους υποδοχείς 5-ΗΤ₃ δεν πραγματοποιείται διαμέσου της περιοχής πρόσδεσης της σεροτονίνης. Πειράματα με στεροειδή συζευγμένα με αλβουμίνη ορού βοός (BSA) και επισημασμένα με ισοθειακυανικό εστέρα της φλουορεσκεΐνης παρείχαν αξιόλογες πληροφορίες, σύμφωνα με τις οποίες τα νευροστεροειδή εισέρχονται στη μεμβράνη από τη μεσόφαση υποδοχέα-μεμβράνης και δρουν ως αλλοστερικοί τροποποιητές της δράσης των 5-ΗΤ₃ υποδοχέων νευρομεταβίβασης με δομικά εκλεκτικό τρόπο.

1.11 Υποδοχείς γλυκίνης

Οι υποδοχείς γλυκίνης (GlyR), όπως και οι υποδοχείς GABA_A, είναι ιονοτρόποι υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούνται από το νευροδιαβιβαστή γλυκίνη και συνιστούν διαύλους ιόντων χλωρίου. Ανήκουν στους υποδοχείς της ανασταλτικής νευροδιαβίβασης με τη μεγαλύτερη κατανομή στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ενεργή συμμετοχή σε ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών¹⁹⁷. Ειδικότερα, γλυκινεργικές συνάψεις εντοπίζονται σε αφθονία στο νωτιαίο μυελό, στα εγκεφαλικά στελέχη, στον ουραίο εγκέφαλο και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, όπου εμπλέκονται στον έλεγχο του ρυθμού κινητικής αναπαραγωγής, στο συντονισμό των αντανακλαστικών αποκρίσεων και στη λειτουργία των ευαίσθητων σημάτων.

Ο ιοντικός δίαυλος αποτελείται από πέντε υπομονάδες οι οποίες περιβάλλουν έναν κεντρικό πόρο, με καθεμία από αυτές να αποτελείται από τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα με δομή *α*-έλικας, όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα **1.17**.



Σχήμα 1.17: Μοντέλο της εξωκυττάριας δομικής περιοχής των υποδοχέων γλυκίνης.

Σε νευρώνες ενηλίκων, η ενεργοποίηση των υποδοχέων γλυκίνης από προσυναπτική γλυκίνη ή από διακυτταρικούς αγωνιστές (π.χ. β-αλανίνη, ταυρίνη) οδηγεί στο άνοιγμα του ιοντικού καναλιού, επιτρέποντας την εισροή ιόντων χλωρίου στο κυτταρόπλασμα. Κατά αυτόν τον τρόπο, επέρχεται υπερπόλωση των προσυναπτικών μεμβρανών, σταθεροποίηση του δυναμικού του κυττάρου και τελικά, αναστέλλεται ο νευρωνικός θάνατος. Συνεπώς, το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των υποδοχέων γλυκίνης από εκρέοντα ιόντα χλωρίου οδηγεί σε αποπόλωση των νευρωνικών μεμβρανών του πλάσματος και σε άνοιγμα των καναλιών ιόντων ασβεστίου¹⁹⁸. Για τους εν λόγω υποδοχείς ανταγωνιστική δράση παρουσιάζουν ενώσεις, όπως η στρυχνίνη και η καφεΐνη, ενώ διπλής κατεύθυνσης είναι οι ρυθμιστικές επιδράσεις των ιόντων ψευδαργύρου, πτητικών αναισθητικών και αλκοολών¹⁹⁹.

Τα νευροστεροειδή, μέσω τροποποίησης της δραστικότητας των υποδοχέων γλυκίνης, προβάλλουν ως ρυθμιστές της νευρωνικής ανάπτυξης. Η προγεστερόνη δρα ανασταλτικά στους υποδοχείς γλυκίνης και παρομοίως, οι θειϊκοί εστέρες της πρεγνενολόνης, της ανδροστερόνης και της δεϋδροεπιανδροστερόνης, καθώς και η δεϋδροεπιανδροστερόνη αναστέλλουν τη νευροδιαβίβαση^{199,200}. Ο θειϊκός εστέρας της πρεγνενολόνης εμφανίζει πλήρως ανταγωνιστική δράση, ενώ η προγεστερόνη εμφανίζει μερικώς μη ανταγωνιστική αναστολή^{199,200}. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα νευροστεροειδή προσδένονται σε ετερογενείς περιοχές, οι οποίες εξαρτώνται από τον προσδέτη και αναστέλλουν την αγωνιστική ενεργοποίηση σε διαφορετικό βαθμό.

Οι ρυθμιστικές επιδράσεις των νευροστεροειδών στους υποδοχείς γλυκίνης είναι διπλής κατεύθυνσης και εξαρτώνται από τη σύσταση των υπομονάδων. Η πρεγνενολόνη ενισχύει τους υποδοχείς γλυκίνης οι οποίοι περιέχουν την *α*1 υπομονάδα, ενώ από την προγεστερόνη και το θειϊκό εστέρα της δεϋδροεπιανδροστερόνης παρατηρείται αναστολή όταν υπάρχει η *α*2 υπομονάδα στους υποδοχείς. Υποδοχείς γλυκίνης οι οποίοι περιέχουν υπομονάδα στους υποδοχείς γλυκίνης οι οποίοι περιέχουν την *α*1 δεϋδροεπιανδροστερόνης παρατηρείται αναστολή όταν υπάρχει η *α*2 υπομονάδα στους υποδοχείς. Υποδοχείς γλυκίνης οι οποίοι περιέχουν υπομονάδες *α* και *θ* δεν ενεργοποιούνται από την πρεγνενολόνη και γενικότερα, παρουσιάζουν μειωμένη αλληλεπίδραση με τα νευροστεροειδή. Τέλος, φαίνεται ότι η ύπαρξη αρνητικού φορτίου στη θέση C3 των νευροστεροειδών είναι απαραίτητη για την εκδήλωση ανταγωνιστικής δράσης, χωρίς όμως να τίθεται ζήτημα στερεοεκλεκτικότητας¹⁹⁹.

1.12 Φυσιολογικός ρόλος των νευροστεροειδών

Η δράση των στεροειδών πραγματοποιείται μέσω της τροποποίησης νευροδιαβιβαστικών υποδοχέων ή μέσω της μεταβολής των ενδοκυττάριων

σημάτων και άρα, τα στεροειδή μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών εγκεφαλικών λειτουργιών. Η GABA-εργική και NMDA-εργική δράση των νευροστεροειδών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτά ρυθμίζουν τη συμπεριφορά με διάφορους τρόπους. Συνεπώς, μεταβολή της βιοσύνθεσης των νευροστεροειδών μπορεί να έχει επίδραση στην αλλαγή της συμπεριφοράς.

1.12.1 Οξύ και χρόνιο στρες

Σε μοντέλα στρες παρατηρείται αύξηση στο πλάσμα και στον εγκέφαλο των συγκεντρώσεων της αλλοπρεγνανολόνης και της αλλοτετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνης, οι οποίες δεν ήταν ανιχνεύσιμες στο πλάσμα πριν και μετά την εκδήλωση τους στρες²⁰¹⁻²⁰³. Τα νευροδραστικά αυτά στεροειδή αναστέλλουν την έκκριση της κορτικοτροπινο-εκλυτικής ορμόνης (CRH) και της αργινίνης-βασοπρεσίνης (AVP) από τον υποθάλαμο.

Τα αυξημένα επίπεδα αλλοπρεγνανολόνης σχετίζονται με την ελάττωση τον επιπέδων της ντοπαμίνης — η οποία προκαλείται και από την 3*α*,5*α*-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνη²⁰⁴ — και της νορεπινεφρίνης στο προμετωπιαίο φλοιό. Συμπερασματικά, η αλλοπρεγνανολόνη μπορεί να επηρεάσει το μονοπάτι της ντοπαμίνης στο μεσοακροφλοίο, ένα σημαντικό σύστημα για την εκδήλωση νευροχημικού στρες²⁰⁵. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των προαναφερθέντων νευροστεροειδών μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα GABA_A, γεγονός το οποίο μπορεί να ερμηνευθεί ως ανάπτυξη προσαρμοστικού μηχανισμού για την αντιστάθμιση της μειωμένης λειτουργίας του υποδοχέα από το οξύ στρες^{24,203}.

1.12.2 Αγχολυτική δράση

Στις αγχώδεις διαταραχές συγκαταλέγονται το μετατραυματικό στρες (posttraumatic stress disorder, PTSD), η φοβία, ο πανικός και οι κρίσεις πανικού. Όλες οι περιπτώσεις συνοδεύονται από μεταβολές των επιπέδων των νευροστεροειδών. Χαρακτηριστική είναι η μείωση της συγκέντρωσης του θειϊκού εστέρα της πρεγνενολόνης, ενώ παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης, της πρεγνενολόνης, της δεϋδροεπιανδροστερόνης, του θειϊκού εστέρα της, της αλλοπρεγνανολόνης και της αλλο-τετραϋδροκορτικοστερόνης. Αυξημένες είναι

επίσης οι συγκεντρώσεις νευροστεροειδών όπως η δεϋδροεπιανδροστερόνη και η αλλο-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνη σε φαρμακολογικά επαγόμενες κρίσεις πανικού^{206,207}, ένδειξη ότι αυτά τα νευροστεροειδή είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπευτική παρέμβαση των αγχωδών διαταραχών.

Νευροστεροειδή όπως η προγεστερόνη, η δεοξυκορτικοστερόνη και τα ανηγμένα ανάλογά τους μειώνουν τη διεγερσιμότητα του νευρικού συστήματος, με τους τετραϋδρο-μεταβολίτες τους να εμφανίζουν ισχυρότερη αγχολυτική δράση. Υπάρχουν πολλές αναφορές για τις αγχολυτικές ιδιότητες της αλλοτετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνης και της αλλοπρεγνανολόνης²⁰⁸ και ιδιαίτερα για την αλλοπρεγνανολόνη φαίνεται ότι η δράση της επιτυγχάνεται μέσω της αμυγδαλής και συνοδεύεται από αύξηση του νευροπεπτιδίου Υ²⁰⁹.

Σε αντίθεση με την αλλοπρεγνανολόνη, οι θειϊκοί εστέρες της πρεγνενολόνης και της δεϋδροεπιανδροστερόνης, αλλά και η δεϋδροεπιανδροστερόνη προκαλούν μεικτές δράσεις στους υποδοχείς GABAA και κατ' επέκταση, και στη συμπεριφορά^{210,211}. Η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός εστέρας της εμφανίζουν αγχολυτική²¹² και αγχογόνο δράση²¹³, ενώ ο θειϊκός εστέρας της πρεγνενολόνης είτε προκαλεί διφασική απόκριση²¹⁴ είτε δεν έχει δράση²¹⁵. Οι αγχολυτικές ιδιότητες της δεϋδροεπιανδροστερόνης και του θειϊκού εστέρα της μπορούν να προκύψουν έμμεσα από το μεταβολισμό αυτών των ορμονών σε ανδροστερόνη και ανδροστανοδιόλη, οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρουν ως θετικοί αλλοστερικοί τροποποιητές των υποδοχέων GABA_A²¹⁶.

Τα νευροδραστικά στεροειδή όπως η αλλο-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνη και η αλλοπρεγνανολόνη συγκέντρωσαν το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας για την ανάπτυξη αναισθητικών βραχείας χρήσεως λόγω του σύντομου χρόνου ημιζωής τους. Το συνθετικό νευροστεροειδές αλφαξολόνη (Σχήμα **1.18**) εμφάνιζε αποτελεσματική αναισθητική δράση, αλλά και μειονεκτήματα τα οποία δεν επέτρεψαν τη χρήση του στον άνθρωπο. Συνεπώς, τα φυσικά νευροστεροειδή αλλο-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνη και αλλοπρεγνανολόνη, τα οποία αποβάλλονται από τον ανθρώπινο οργανισμό σε μικρό χρονικό διάστημα υπερτερούν και χρησιμοποιούνται ευρέως ως αναισθητικά σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από ηπατικά και νεφρικά προβλήματα²⁴.


Σχήμα 1.18: Δομή του συνθετικού αναισθητικού νευροστεροειδούς αλφαξολόνη (3α-υδροξυ-5α-πρεγνανο-11,20-διόνη).

1.12.3 Μνήμη

Τα νευροστεροειδή σε πειράματα σε τρωκτικά επιδρούν στη μνήμη. Έγχυση αλλοπρεγνανολόνης σε βασικούς μαγνοκυτταρικούς πυρήνες επίμυος διαταράσσει τη μνήμη, σε αντιπαράθεση με το θειϊκό εστέρα της πρεγνενολόνης που την ενισχύει²¹⁷, ενώ όμοια αποτελέσματα λαμβάνονται και μετά από διαπαρεγκεφαλιδοκοιλιακή έγχυση των προηγούμενων ουσιών²¹⁸. Για το δε θειϊκό εστέρα της πρεγνενολόνης πιστεύεται ότι δρα, εν μέρει, αυξάνοντας την έκκριση της ακετυλοχολίνης στον ιππόκαμπο⁴⁰.

Η πρεγνενολόνη, η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός εστέρας της επίσης ενισχύουν τη μνήμη σε μύες μετά από έγχυσή τους στην εγκεφαλική κοιλία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρόλο που η αλλοπρεγνανολόνη (θετικός αλλοστερικός τροποποιητής) και ο θειϊκός εστέρας της δεϋδροεπιανδροστερόνης (αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής) έχουν αντίθετη επίδραση στον υποδοχέα GABA_A, και τα δύο νευροστεροειδή ενισχύουν τη μνήμη αναφοράς, την εργαζόμενη ή ενεργό μνήμη και τη μακροπρόθεσμη μνήμη²¹⁹.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα²²⁰ υποδηλώνουν ότι η ενίσχυση της μνήμης από τη δράση των νευροστεροειδών γίνεται μέσω ρύθμισης των σ υποδοχέων²²¹, δεδομένου ότι τα φαινόμενα αυτά εμποδίζονται παρουσία ανταγωνιστών των σ υποδοχέων.

1.12.4 Σπασμολυτικές ιδιότητες

Οι επιληπτικές διαταραχές έχουν συσχετισθεί με τις μεταβολές στη νευροδιαβίβαση μέσω γ-αμινοβουτυρικού οξέος, με αποτέλεσμα οι περισσότερες

από τις αντιεπιληπτικές θεραπείες να στοχεύουν στον υποδοχέα GABA_A. Στους ανθρώπους, η επιληψία επηρεάζεται από παράγοντες όπως η διάρκεια της εφηβείας, η εγκυμοσύνη και το στρες, υποδεικνύοντας ότι σχετίζεται με τα επίπεδα των ορμονών^{222,223}. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα ανδρογόνα και τα προγεστογόνα εμπλέκονται στη ρύθμιση της επιληψίας, καθώς και στη συχνότητα εμφάνισης της.

Διάφορες *in vitro και in vivo* μελέτες έδειξαν ότι τα GABA_A αγωνιστικά νευροστεροειδή εμφανίζουν σημαντική σπασμολυτική δράση (μείωση της συχνότητας και της έντασης των επιληπτικών κρίσεων), η οποία θέτει τις βάσεις για περαιτέρω κλινική εφαρμογή^{224,225}. Αντίθετα, τα GABA_A ανταγωνιστικά νευροστεροειδή είναι ανενεργά, γεγονός το οποίο και επιβεβαιώνει τις αρχικές υποθέσεις ότι η ανεπαρκής GABA-εργική νευροδιαβίβαση είναι καθοριστικός παράγοντας για τη δημιουργία των επιληπτικών κρίσεων^{216,226}.

1.12.5 Αντιψυχωσική δράση

Προκλινικές μελέτες σε επίμυες σχετίζουν συμβατικά αντιψυχωσικά φάρμακα (εκτός της αλοπεριδόλης) με τις συγκεντρώσεις των νευροστεροειδών στο πλάσμα και στον εγκέφαλο. Πιο συγκεκριμένα, απλή χορήγηση ολανζαπίνης ή κλοζαπίνης αυξάνει τα επίπεδα της προγεστερόνης, της αλλοπρεγνανολόνης και της αλλο-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνης στον εγκεφαλικό φλοιό και στο ραβδωτό σώμα²²⁷⁻²²⁹, ενώ παρατεταμένη χορήγηση κλοζαπίνης μειώνει τα επίπεδα της δεϋδροεπιανδροστερόνης και του θειϊκού εστέρα της στον εγκεφαλικό φλοιό²³⁰. Επίσης, κλοζαπίνη δε μεταβάλλει τις φλοιώδεις ŋ συγκεντρώσεις αλλοπρεγνανολόνης και αλλο-τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνης σε επίμυες οι οποίοι έχουν υποστεί γοναδεκτομή-επινεφριδεκτομή²²⁸, με αποτέλεσμα η μειωμένη σύνθεση των νευροστεροειδών να συμβάλλει στην παθογένεση της ψύχωσης.

Όσον αφορά στη σχιζοφρένεια, έχει διαπιστωθεί μια συσχέτιση των εκδηλούμενων συμπτωμάτων σε πάσχοντα άτομα και των συγκεντρώσεων δεϋδροεπιανδροστερόνης και του θειϊκού της εστέρα στο πλάσμα²³¹. Ωστόσο, αυξημένα επίπεδα των παραπάνω νευροστεροειδών έχουν ανιχνευθεί τόσο σε ψυχωτικούς ασθενείς, όσο και σε σχιζοφρενείς οι οποίοι λαμβάνουν

δεϋδροεπιανδροστερόνη, στα πλαίσια θεραπευτικής αντιμετώπισης συμπτωμάτων κατάθλιψης και αγχώδους διαταραχής τα οποία συνοδεύουν αυτή τη σοβαρή ψυχική νόσο²³².

1.12.6 Αντικαταθλιπτική δράση

Στη μείζονα κατάθλιψη, οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων αλλοπρεγνανολόνης και 3*α*,5*θ*-τετραϋδροπρογεστερόνης στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών είναι ελαττωμένες συγκριτικά με τα φυσιολογικά επίπεδα^{233,234}. Συνεπώς, τα νευροστεροειδή φαίνεται ότι σχετίζονται με την παθοφυσιολογική δυσλειτουργία την οποία εκδηλώνουν οι πάσχοντες από κατάθλιψη. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι αυξάνοντας τις χαμηλές συγκεντρώσεις των νευροστεροειδών σε καταθλιπτικούς ασθενείς, είναι δυνατή μια επιτυχής αντικαταθλιπτική θεραπεία, επιπλέον δε ότι μια δυσλειτουργία στη σύνθεση των νευροστεροειδών μπορεί να οδηγήσει σε εκδήλωση κατάθλιψης.

Τα νευροστεροειδή διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην κατάθλιψη, ακόμα και όταν αποτελεί φυσιοπαθολογική διάσταση κάποιας άλλης ψυχικής διαταραχής. Ειδικότερα, τα αυξημένα επίπεδα δεϋδροεπιανδροστερόνης και του θειϊκού εστέρα της σε άτομα πάσχοντα από μετα-τραυματικό στρες συνδέονται με τις απόπειρες αυτοκτονίας²³⁵. Για αυτό το λόγο, εικάζεται ότι, ανάμεσα σε άλλους νευροβιολογικούς παράγοντες, τα επίπεδα των στεροειδών, τα βιοσυνθετικά τους ένζυμα και ο μεταβολισμός τους μπορεί να συνιστούν το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην καταθλιπτικές διαταραχές και άλλες ψυχικές νόσους, όπως η νόσος Parkinson (PD)²³⁶.

1.12.7 Προεμμηνορροϊκή δυσφορία (PDD) και κατάθλιψη μετά τον τοκετό (PND)

Η διαταραχή προεμμηνορροϊκής δυσφορίας (premenstrual dysphoria disorder) χαρακτηρίζεται από συμπτώματα τα οποία παρατηρούνται κατά τη διάρκεια των τελευταίων εβδομάδων της ωχρινικής φάσης του έμμηνου κύκλου. Τα αίτια της εμφάνισης αυτής της διαταραχής δεν έχουν εξακριβωθεί, αλλά λόγω της κυκλικής εκδήλωσης των συμπτωμάτων υποτέθηκε ότι μπορεί να εμπλέκονται μια ή περισσότερες ωοθηκικές ορμόνες ή παράγωγα νευροστεροειδών. Γυναίκες οι

οποίες έπασχαν από προεμμηνορροϊκή δυσφορία μπορούσαν να αντιμετωπίσουν την κατάθλιψη τους επιτυχώς μετά από θεραπεία με τους αναστολείς SSRIs²³⁷⁻²³⁹.

Αλλαγές στη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και μετά τον τοκετό μπορεί να οφείλονται σε μεταβολές των νευροστεροειδών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αύξηση των συγκεντρώσεων οιστρογόνων και προγεστερόνης επιφέρει αύξηση της σύνθεσης των νευροστεροειδών, καθώς και μεταβολές της λειτουργίας του GABA_A υποδοχέα. Τα επίπεδα της αλλοπρεγνανολόνης και της προγεστερόνης αυξάνουν προοδευτικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης²⁴⁰, όμως στη περίοδο μετά τον τοκετό δεν έχουν ανιχνευθεί επίπεδα αλλοπρεγνανολόνης.

1.12.8 Μυελίνωση

Η μυελίνη είναι μία πρωτεΐνη με σπειροειδή δομή η οποία εγκλείει τους νευράξονες των εμμύελων νευρικών ινών, σε αντίθεση με τους άξονες οι οποίοι δεν επικαλύπτονται από αυτή και ονομάζονται αμύελοι. Η μυελίνη περιβάλλει όλους τους νευρώνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα αποτελείται από λιποπρωτεϊνικές κυτταρικές μεμβράνες κυττάρων Schwann, ενώ στο κεντρικό νευρικό σύστημα παράγεται και συντηρείται από τα κύτταρα της ολιγοδενδρογλοίας (Σχήμα **1.19**). Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι πολύ εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία μπορούν να διατηρούν από μία έως σαράντα ξεχωριστές θήκες μυελίνης, ιδιότητα εξαρτώμενη από το μέγεθος του άξονα με τον οποίο σχετίζονται. Η παρουσία αυτού του "μονωτικού υλικού" βελτιώνει την αποδοτικότητα με την οποία οι άξονες άγουν τα δυναμικά ενέργειας και επιτρέπει την ταχεία αγωγή των νευρικών ώσεων στις μεγάλες αποστάσεις μεταξύ εγκεφάλου και άκρων.



Σχήμα 1.19: Δομή ενός τυπικού νευρώνα επικαλυμένου με μυελίνη.

Η παραγωγή μυελίνης αποκαλείται μυελίνωση, ενώ η απώλεια του ελύτρου μυελίνης από τους νευράξονες ονομάζεται απομυελίνωση και είναι χαρακτηριστικό νευροεκφυλιστικών αυτοάνοσων ασθενειών, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας. Η μυελίνωση λαμβάνει χώρα από την δέκατη τέταρτη εβδομάδα της ανάπτυξης του εμβρύου, ενώ η ποσότητα μυελίνης στον εγκέφαλο είναι πολύ μικρή κατά τη στιγμή της γέννησης. Κατά τη βρεφική ηλικία η μυελίνωση πραγματοποιείται με ταχείς ρυθμούς και συνεχίζεται έως την εφηβεία. Η μυελίνη υπόκειται σε εκφυλισμό λόγω γήρανσης, ο οποίος δεν έχει πλήρως μελετηθεί. Παρόλα αυτά, μορφολογικές αναλύσεις λευκής ουσίας από εγκέφαλους ηλικιωμένων πιθήκων έδειξαν ότι οι αλλαγές τις οποίες υφίσταται η μυελίνη του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι παρόμοιες με τις αλλαγές της μυελίνης του περιφερικού νευρικού συστήματος.

Η προγεστερόνη επηρεάζει το σχηματισμό και τη διόρθωση των θηκών μυελίνης²⁴¹⁻²⁴³ μέσω αύξησης της μεταγραφής των γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεϊνοσύνθεση της μυελίνης. Στην ουσία, η προγεστερόνη αυξάνει τον αριθμό των ολιγοδενδροκυττάρων τα οποία εκφράζουν τη βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP) και την 3'-φωσφοδιεστεράση του 2',3'-κυκλικού νουκλεοτιδίου (CNPase) σε καλλιέργειες γλοιακών κυττάρων από εγκέφαλο νεογνού επίμυος²⁴⁴. Είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο η προγεστερόνη, όσο και η άμεση πρόδρομή της ένωση πρεγνενολόνη συντίθεται στα κύτταρα Schwann τα οποία ρυθμίζουν το σχηματισμό και τη μόνωση των νευραξόνων⁴⁷. Επίσης, στα παρεγκεφαλικά κύτταρα η προγεστερόνη προάγει τη μυελίνωση, προκαλώντας τον τη σύνθεση της προγεστερόνης αποκλειστικά στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των ολιγοδενδροκυττάρων και υπογραμμίζει τη σημασία της αλλοπρεγνανολόνης στους πρόδρομους των ολιγοδενδροκυττάρων³⁷.

Στο Σχήμα **1.20** παρατίθεται σε μεγέθυνση φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο η οποία απεικονίζει νευράξονες επικαλυμμένους με πολλαπλά στρώματα μυελίνης.



Σχήμα 1.20: Φωτογραφία εμμύελων νευρικών ινών η οποία έχει ληφθεί μέσω σαρωτικής ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας (SEM).

1.12.9 Οργανογένεση-Νευρογένεση

Η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός εστέρας της ρυθμίζουν εκλεκτικά την αύξηση των νευρώνων στις περιοχές όπου εκφράζεται το ένζυμο P450c17^{75,246}. Η τοπικά παραγόμενη δεϋδροεπιανδροστερόνη επιδρά σημαντικά στην ανάπτυξη των φλοιϊκών νευρώνων από έμβρυο επίμυος, ενώ επάγει και το σχηματισμό των συνάψεων του νωτιαίου μυελού σε νευρώνες ιππόκαμπου^{247,248}. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (nM), το εν λόγω νευροστεροειδές προάγει την επιμήκυνση των νευραξόνων, επιδρώμντας κατά αυτόν τον τρόπο στην ανάπτυξη των νευρώνων⁷⁵. Αντιθέτως, ο θειϊκός εστέρας της δεϋδροεπιανδροστερόνης επηρεάζει την ανάπτυξη διακλαδώσεων²⁴⁹. Н των δενδριτών και των δε αναλογία της δεϋδροεπιανδροστερόνης έναντι του θειϊκού εστέρα της μπορεί να ρυθμίζει

εκλεκτικά την παραγωγή των νευρώνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νεοφλοιού και ως εκ τούτου, τη διαμόρφωση των προβολών και των συνάψεων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η αλλοπρεγνανολόνη φαίνεται να επάγει τη νευριτική επιμήκυνση στον αναπτυσσόμενο υποθάλαμο και για αυτό το λόγο, συμπεραίνουμε ότι τα νευροστεροειδή τα οποία παράγονται *de novo* στο νευρικό σύστημα προάγουν, καθοδηγούν και τελειοποιούν την ανάπτυξη των νευραξόνων και των συνάψεων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο^{14,37}.



Σχήμα 1.21: Πρώτα στάδια της νευρογένεσης.

Όσον αφορά στη νευρογένεση (Σχήμα 1.21), η δεϋδροεπιανδροστερόνη, αλλά όχι τα παράγωγά της, αυξάνει τον αριθμό των σχηματιζόμενων νευρώνων του οδοντωτού έλικα στον ιππόκαμπο επίμυος, ενώ ανταγωνίζεται την κατασταλτική επίδραση της κορτικοστερόνης στη νευρογένεση και τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρώνων. Η επίδραση της στη νευρογένεση στηρίζεται στην αγωνιστική της δράση στους υποδοχείς NMDA και σ η οποία προκαλεί αύξηση του βλαστοκυττάρων²⁵⁰. πολλαπλασιασμού νευρικών των Γενικότερα, η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός εστέρας της εκδηλώνουν αντίθετες δράσεις στην ανάπτυξη του κεντρικού συστήματος και την καθοδήγησή του προς τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι κατά τη γήρανση μειώνονται τα επίπεδα των προαναφερθέντων νευροστεροειδών και αυτή η συναρτησιακή σχέση επεξηγεί τη μη αναπλήρωση των νευρώνων, καθώς και τις εγκεφαλικές ατροφίες οι οποίες και σχετίζονται με τη γήρανση και την περιορισμένη δράση των νευροστεροειδών αυτών.

Πρόσφατα αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία από την ομάδα του Α. Γραβάνη²⁵¹ η αλληλεπίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης με τους μεμβρανικούς υποδοχείς TrkA και p75^{NTR} του νευροαυξητικού παράγοντα (NGF) (Σχήμα **1.22**). Συνεπώς, η δεϋδροεπιανδροστερόνη δρα συνεργηστικά με το νευροαυξητικό παράγοντα τόσο ως προς τη διαμόρφωση του εγκεφάλου, όσο και κατά την προστασία των νευρώνων από την απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του. Η γήρανση και οι νευροεκφυλιστικές συνθήκες συσχετίζονται με τη μειωμένη παραγωγή των δύο παραπάνω παραγόντων και άρα, με τη μειωμένη προστατευτική ικανότητά τους έναντι της νευροτοξικότητας στον εγκέφαλο. Λαμβάνοντας υπόψη τα νέα δεδομένα και φυλογενετικές μελέτες σχετικά με την εξέλιξη των νευροτροφινών, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η δεϋδροεπιανδροστερόνη λειτουργούσε ως ένας φυλογενετικά αρχέγονος νευροτροφικός παράγοντας. Η αποκάλυψη αυτή μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό μη ενδοκρινικών, νευροπροστατευτικών, νευρογενών και μικρομοριακών αγωνιστών του νευροαυξητικού παράγοντα με βάση της δομή της δεϋδροεπιανδροστερόνης.





Πολλές ερευνητικές εργασίες αποδίδουν ρόλο-κλειδί στην αλλοπρεγνανολόνη σχετικά με την ατροφία του εγκεφάλου η οποία επέρχεται από τη γήρανση, αλλά και αναφορικά με νευροεκφυλιστικές νόσους (π.χ. νόσος Alzheimer's)^{252,253}. Η αλλοπρεγνανολόνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων στον ιππόκαμπο επίμυος και στον εγκεφαλικό φλοιό ανθρώπου. Επίσης, σε καλλιέργειες νευρώνων ιππόκαμπου έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί απομάκρυνση των νευρώνων, οι οποίοι δεν επικοινωνούν με άλλους νευρώνες ή με τη γλοία. Εξίσου αξιόλογη είναι η ενισχυτική επίδραση της αλλοπρεγνανολόνης στα γονίδια τα οποία προωθούν τη μίτωση με την αντίστοιχη καταστολή των γονιδίων, τα οποία παρεμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δράση αυτή του συγκεκριμένου νευροστεροειδούς φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη και εναντιοεκλεκτική, αφού το αντίστοιχο 3*β*-ισομερές δε δρα παρομοίως.

Η ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα GABA_A και του πυρηνικού υποδοχέα πρεγνάνιο X (υπεύθυνος για την ανίχνευση τοξικών ουσιών και την αποτοξίνωση)²⁵⁴ από την αλλοπρεγνανολόνη κατά την εμβρυϊκή και νεογνική ανάπτυξη ενισχύει τη νευρογένεση, τον πολλαπλασιασμό των νευρώνων, την επιβίωση, τη μετανάστευση και τη δομική τους επιδιόρθωση. Το σύνολο των σημαντικών αυτών ιδιοτήτων της αλλοπρεγνανολόνης την καθιστά θεραπευτικά ένα πολλά υποσχόμενο νευροστεροειδές, με δυνατότητα επαγωγής της νευρογένεσης και της δομικής αναγέννησης των ατροφικών βλαβών του κεντρικού νευρικού συστήματος στη γήρανση και κυριότερα, σε ασθενείς οι οποίοι αναρρώνουν από νευροεκφυλιστικές νόσους ή σοβαρούς τραυματισμούς του κεντρικού νευρικού συστήματος^{252,255}.

1.12.10 Διαφοροποίηση ολιγοδενδροκυττάρων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η προγεστερόνη ρυθμίζει τη σύνθεση μυελίνης, βελτιώνει δε τη μυελίνωση τραυματισμένων νευρώνων *in vivo*⁶⁶ και προάγει τη μυελίνωση *in vitro*²⁵⁶. Σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα, η προγεστερόνη, η οιστραδιόλη και η ινσουλίνη, καθώς και ο συνδυασμός προγεστερόνης και ινσουλίνης αυξάνουν την έκφραση της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης και της CNPασης²⁵⁷, υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι παράγοντες προάγουν την ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων *in vitro*. Ο μηχανισμός δράσης προγεστερόνης και ινσουλίνης δεν έχει όμως αποσαφηνισθεί. Το Σχήμα **1.23** αναπαριστά τα στάδια διαφοροποίησης τα οποία ακολουθούν τα ολιγοδενδροκύτταρα (γλοιακά κύτταρα) κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος.



Σχήμα 1.23: Απεικόνιση των διαδοχικών φάσεων της διαφοροποίησης των ολιγοδενδροκυττάρων από τις πρόδρομες μορφές τους και μοριακοί δείκτες οι οποίοι συμμετέχουν σε αυτή τη μορφολογική αλλαγή²⁵⁸.

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η *de novo* σύνθεση της προγεστερόνης πιθανόν να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα²⁵⁶. Φυσικά, απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες προκειμένου να εξακριβωθεί εάν η προγεστερόνη είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων σε περιφερικούς και κεντρικούς νευρώνες ή αν η έκφραση των στεροειδογενετικών ενζύμων στα ολιγοδενδροκύτταρα προέρχεται από τη διαφοροποίησή τους. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση είναι σαφές ότι τα ενδογενώς παραγόμενα νευροστεροειδή διαδραματίζουν έναν βασικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων-στόχων τους στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα, ο οποίος εξαρτάται από τη θέση τους και τη φάση της ανάπτυξης¹⁴.

1.13 Κυτταρικός θάνατος

1.13.1 Νέκρωση

Η νέκρωση αντιστοιχεί σε παθητική και ανεξέλεγκτη μορφή κυτταρικού θανάτου και το ερέθισμα είναι πάντοτε κάποια βλαπτική επίδραση. Είναι δυνατόν να προέλθει από τραυματισμό, μόλυνση, ασθένεια, επίδραση τοξινών ή από μια παθολογική κατάσταση και παραδοσιακά έχει συσχετιστεί με έναν ή περισσότερους παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν σε μη φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο. Αυτό μπορεί να διαχωριστεί σε δυο κυρίως στάδια: στο θάνατο του κυττάρου που καθορίζεται από αμετάκλητες μεταβολές των κυτταρικών μηχανισμών, οι οποίοι δίνουν τη δυνατότητα στο κύτταρο να διατηρεί την ομοιόσταση του, και στον επακόλουθο εκφυλισμό του «αποθανόντος» κυττάρου²⁵⁹.

Γενικά, η νέκρωση προσβάλλει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων τα οποία συχνά εμφανίζονται ομαδοποιημένα και δεν υφίσταται καμιά ρύθμιση. Αρχικά, η βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη προκαλεί ανεξέλεγκτη εισροή ιόντων και νερού στο κυτταρόπλασμα, με συνέπεια τη διόγκωση των κυττάρων και των οργανιδίων τους. Παράλληλα, στον πυρήνα η χρωματίνη συσσωρεύεται σε μάζες ασαφούς περιγράμματος και σε αυτήν οφείλονται οι μορφολογικές αλλαγές στα αμετάκλητα τραυματισμένα κύτταρα. Το DNA αποδομείται με τυχαία κατανομή και διάρρηξη της πυρηνικής μεμβράνης (καρυόλυση του πυρήνα). Μερικές φορές, λαμβάνει χώρα πύκνωση της μήτρας των διογκωμένων μιτοχονδρίων και διάσπαση των κυτταρικών οργανιδίων και των μεμβρανών. Σε προχωρημένα στάδια, η απώλεια ακεραιότητας της μεμβράνης οδηγεί σε λύση του κυττάρου, απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών στον εξωκυττάριο χώρο και φλεγμονώδη αντίδραση, ενώ με τον κυτταρικό θάνατο εξαφανίζεται και η χρωματίνη.

1.13.2 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (PCD), βιολογικό φαινόμενο, το οποίο παρατηρείται σε όλους τους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Πρόκειται για μια αλληλουχία βιοχημικών διεργασιών σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο οι οποίες επιφέρουν χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα και τελικά, οδηγούν στο θάνατό τους^{260,261}. Αυτός ο υψηλά φυλογενετικός συντηρητικός μηχανισμός έχει αναγνωρισθεί ως μια διαδικασία εξαιρετικά σημαντική για τον έλεγχο του τελικού αριθμού των νευρώνων και των γλοιακών κυττάρων στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Επιπλέον, η απόπτωση ευθύνεται για την απώλεια των νευρώνων κατά τη φυσιολογική γήρανση^{262,263}.

Η απόπτωση έχει θεμελιώδη σημασία τόσο για την ανάπτυξη, όσο και για τη διατήρηση της δομής και της οργάνωσης των πολυκύτταρων οργανισμών. Συμβαίνει κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, αλλά και κατά την υπόλοιπη ζωή του ώριμου οργανισμού. Μέσω αυτής απομακρύνονται κύτταρα, δομές ή τμήματα ιστών τα οποία είτε δεν είναι απαραίτητα πλέον είτε δημιουργούν προβλήματα. Με αυτόν τον τρόπο, διατηρείται σταθερός ο αριθμός των κυττάρων σε ιστούς με ταχεία κυτταρική ανανέωση — όπως γίνεται και με τα κύτταρα του αίματος — και απομακρύνονται κύτταρα τα οποία έχουν επιτελέσει το ρόλο τους κατά την ανάπτυξη, όπως οι μη σωστά προσδεδεμένοι νευρώνες κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Περίπου οι μισοί από το σύνολο των νευρώνων στους νευράξονες και περισσότερα από το 99.9% των κυττάρων τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου οδηγούνται στο θάνατο μέσω της απόπτωσης. Αξιοσημείωτη είναι και η αμυντική λειτουργία της απόπτωσης, αφού οδηγεί στο θάνατο κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβη στο γενετικό τους υλικό ή έχουν μολυνθεί από ιούς και παρεμποδίζει την εξάπλωση βλαβερών μεταλλάξεων. Παρόλα αυτά, όταν η απόπτωση πραγματοποιείται σε υπερβολικό βαθμό, προκαλείται ατροφία, ενώ στην αντίθετη περίπτωση επέρχεται ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός (καρκίνος).

Συνοπτικά, τα στάδια της απόπτωσης περιλαμβάνουν σχηματισμό κυστών, κυτταρική συρρίκνωση, συμπύκνωση χρωματίνης και κυτοπλασμική συμπύκνωση, χρωμοσωμική, πυρηνική και κυτταρική διάσπαση, φαγοκύτωση. Η αλλαγή του πυρήνα του κυττάρου αποτελεί την πρώτη ένδειξη έναρξης της απόπτωσης. Ακολουθεί συμπύκνωση της χρωματίνης και διαχωρισμός της σε ζωηρές διαγραφόμενες μάζες στον πυρηνικό φάκελο και στη συνέχεια, πυρηνική πύκνωση. Ταυτόχρονα με τις πυρηνικές αλλαγές, παρατηρείται μια συμπύκνωση του κυτοπλάσματος και οι κυτταρικές μεμβράνες συσπειρώνονται με εμφάνιση κυστιδίων διαφόρων μεγεθών, με αποτέλεσμα το κύτταρο να ομοιάζει με άστρο. Καθώς η πυκνότητα του κυτοπλάσματος αυξάνεται, εμφανίζονται ορισμένα χυμοτόπια, ενώ τα κυτταρικά οργανίδια παραμένουν ανεπηρέαστα, μολονότι λαμβάνουν τη μορφή πυκνών στοιβάδων ως συνέπεια της έλλειψης κυτοσόλης. Ωστόσο, τα ριβοσώματα μπορούν να αποσπαστούν από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και από τα πολυσώματα και τελικά, να εξαφανιστούν. Σε μεταγενέστερα

στάδια, κύτταρο και πυρήνας λαμβάνουν ένα πιο ανώμαλο σχήμα και η πυρηνική εκβλάστηση φαίνεται να παράγει διακριτά κομμάτια, τα οποία περιβάλλονται από άθικτο πυρηνικό φάκελο. Σε τελική φάση, το κύτταρο διασπάται σε αποπτωτικά σώματα, τα οποία απορροφώνται ταχέως από τα φαγοκύτταρα, προκειμένου να αποτραπεί η πρόκληση βλαβών στα περιβάλλοντα κύτταρα (Σχήμα **1.24**)²⁶⁴.



Σχήμα 1.24: Απεικόνιση της φαγοκύττωσης, όπου τα αποπτωτικά σώματα του "θανόντος" κυττάρου απορροφώνται από τα μακροφάγα κύτταρα.

Η απόπτωση ρυθμίζεται από μια ποικιλία κυτταρικών σημάτων, εξω- και ενδοκυττάριων. Οι εξωκυττάριοι "αγγελιοφόροι" μπορεί να είναι τοξίνες, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, νιτρικό οξύ ή κυτταροκίνες, οι οποίοι εισέρχονται στο κύτταρο ή επάγουν κάποια απόκριση και δύνανται να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν την απόπτωση. Ειδικότερα, τα κυτταρικά αυτά σήματα ενεργοποιούν κατάλληλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στην αποπτωτικό καταρράκτη και καθορίζουν τη "μοίρα" του κυττάρου. Οι δύο βασικότερες μέθοδοι ρύθμισης είναι μέσω της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων ή με απευθείας αήματα μπορεί να είναι βλάβες στο γενετικό υλικό (κληρονομικές ή επαγόμενες), αυξημένη έκφραση του γονιδίου p53, μεταβολικό στρες (υποξία και υπογλυκαιμία), τα οποία οδηγούν στη δημιουργία πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, από όπου

και εκκρίνονται αποπτωτικοί μοριακοί δείκτες (π.χ. κυτόχρωμα C, παράγοντας πρόκλησης απόπτωσης AIF)²⁶⁵.

1.13.3 Απόπτωση νευρώνων-Μηχανισμοί νευροεκφύλισης

Οι άμεσες και χρόνιες βλάβες του νευρικού ιστού ως απόκριση σε ένα τοξικό παράγοντα επιφέρουν μια σειρά κυτταρικών ενεργειών, οι οποίες καταλήγουν στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο των νευρώνων, άμεσο ή καθυστερημένο, και στην νευροεκφύλιση μιας δομής του νευρικού συστήματος. Επομένως, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι χαρακτηρίζονται μορφολογικά από την προοδευτική απώλεια κυττάρων σε συγκεκριμένους ευπαθείς νευρικούς πληθυσμούς του κεντρικού νευρικού συστήματος, συχνά συνοδευόμενους από συσσώρευση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και ανάπτυξη γλοίωσης. Στα αίτια των νευροεκφυλιστικών νόσων συγκαταλέγονται και οι περιβαλλοντικές παράμετροι με προεξάρχουσα τη φυσιολογική γήρανση, αλλά και τοξικούς, μικροβιακούς παράγοντες και τραύματα. Η ενδογενής νευροεκφύλιση μπορεί να είναι απόρροια υπερδιεγερσιμότητας από το γλουταμικό οξύ, εγκεφαλικής ισχαιμίας, στέρησης αυξητικών παραγόντων από τον ιστό-στόχο, οξειδωτικού στρες ή ελλειπούς παραγωγής ενέργειας²⁶⁶. Φυσικά, και το χρόνιο ή το άμεσο στρες μπορεί εξίσου να εκκινήσει τις διαδικασίες νευροεκφύλισης. Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να σημειώσουμε ότι όλοι οι προαναφερόμενοι παράγοντες δρουν συνήθως συνεργηστικά, καταλήγοντας στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων. Οι κύριοι μηχανισμοί νευροεκφύλισης κινητοποιούνται από τις παρακάτω αιτίες (Σχήμα **1.25**):

 Μη φυσιολογική δυναμική πρωτεϊνών με ελαττωματική συσσώρευση ή αποικοδόμηση πρωτεϊνών.

Οξειδωτικό στρες και σχηματισμός ελευθέρων ριζών.

3) Μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες και ενεργειακή ανισορροπία.

4) Τοξικότητα από διεγερτικά αμινοξέα η οποία καταλήγει σε άνοιγμα καναλιών νατρίου και ασβεστίου, εκπόλωση της μεμβράνης κι έναρξη ενός καταρράκτη κυτταρικών λειτουργιών οι οποίες καταλήγουν στον κυτταρικό θάνατο.

5) Νευροανοσολογικές διαταραχές (π.χ. τοξικότητα κυτοκινών).

6) Στέρηση αυξητικών παραγόντων²⁶⁷.



Σχήμα 1.25: Μονοπάτια απόπτωσης.

Η γονιδιακή ρύθμιση της απόπτωσης στα νευρικά κύτταρα έχει μελετηθεί στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*²⁶⁸. Τα γονίδια *ced-3, ced-4, ced-9* και *egl-1* είναι υπεύθυνα για την «εκτέλεση» των κυττάρων μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου²⁶⁹. Από γενετικές μελέτες έχει προκύψει ότι τα γονίδια *ced-3* και *ced-4* είναι απαραίτητα για την κυτταρική εκτέλεση, ενώ το *ced-9* είναι ένας παράγοντας επιβίωσης ο οποίος καταστέλλει τη δραστικότητα των *ced-3* και *ced-4*. Επίσης, η πρωτεΐνη CED-4 δεν είναι άμεσα υπεύθυνη για το θάνατο των κυττάρων, αλλά δρα σαν φορέας μορίων τα οποία ρυθμίζουν τη δραστικότητα της CED-3.

1.13.3.1 Κασπάσες

Οι μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές οι οποίες πραγματοποιούνται κατά την απόπτωση είναι αποτέλεσμα της δράσης μιας οικογένειας κυστεϊνικών πρωτεασών οι οποίες ονομάζονται κασπάσες (cysteine *asp*artyl-specific prote*ases*). Οι κασπάσες (ομόλογες της πρωτεΐνης CED-3) κατέχουν θεμελιώδη ρόλο όχι μόνο στην απόπτωση, αλλά και στη νέκρωση, στη φλεγμονή, στην ανάπτυξη και σε άλλες διεργασίες του ενήλικου οργανισμού, ενώ ενεργοποιούνται μέσω ενός καταρράκτη αυτο-πολλαπλασιασμού. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστές δεκατέσσερις διαφορετικές κασπάσες, από τις οποίες δώδεκα έχουν εντοπισθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι αποπτωτικές κασπάσες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της *N*-τελικής περιοχής τους²⁷⁰: α) τις κασπάσες έναρξης (π.χ. κασπάσες-1, -8, -9), οι οποίες ενεργοποιούν τις κασπάσες τελεστές, διασπώντας μη δραστικές προ-μορφές τους και β) τις κασπάσες τελεστές (π.χ. κασπάσες-3, -6, -7), οι οποίες ακολούθως διασπούν εντός του κυττάρου άλλες πρωτεϊνες οι οποίες μεσολαβούν στην απόπτωση. Στο Σχήμα **1.26** παριστάνεται απλουστευμένα η δράση των κασπασών.



Σχήμα 1.26: Ενεργοποίηση των κασπασών²⁷¹.

Στους νευρώνες, η κασπάση-8 ενεργοποιείται μέσω διαφορετικών αποπτωτικών ερεθισμάτων. Αυτός ο εκκινητής του εξωκυτταρικού σηματοδοτικού

μονοπατιού διαθέτει στο *N*-τελικό άκρο μία τελεστική περιοχή θανάτου (*death effector domain*, DED). Αυτή η μορφολογική της ιδιαιτερότητα τής επιτρέπει να αλληλεπιδρά με άλλες DED πρωτεΐνες (π.χ. FADD) και να συμμετέχει στο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου μέσω των υποδοχέων "θανάτου" της οικογένειας TNF²⁷⁰.

1.13.3.2 Παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικής πρωτεάσης Apaf1

Η ομόλογη της πρωτεΐνης CED-3 στα θηλαστικά είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικής πρωτεάσης 1 (apoptosis protease activator factor 1, Apaf1) και κατέχει κομβικό ρόλο στο ρυθμιστικό μηχανισμό της απόπτωσης. Στην αρχή της απόπτωσης, το κυτόχρωμα C απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και μαζί με τη τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATP) δεσμεύεται από τον παράγοντα Apaf1 και σχηματίζει ένα μεγάλο κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το αποπτώσωμα²⁷². Το αποπτώσωμα διασπά την προ-κασπάση-9, με τρόπο ο οποίος δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος^{273,274}, και η ενεργή μορφή της η οποία προκύπτει ενεργοποιεί την κασπάση-3²⁷⁵, καθοδηγώντας τον καταρράκτη των κασπασών και της αποπτωτικής διαδικασίας. Βιοχημικές μελέτες αποκάλυψαν ότι οι κασπάσες-3 και -9 απαιτούν τον παράγοντα Apaf1 και το κυτόχρωμα C και συμμετέχουν στο μιτοχονδριακά συσχετιζόμενο κυτταρικό θάνατο²⁷⁶.

1.13.3.3 Πρωτεΐνες Bcl-2

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 ελέγχουν και τροποποιούν τις μεταβολές της μιτοχονδριακής λειτουργίας κατά την απόπτωση. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες εμφανίζουν προ-αποπτωτικές ιδιότητες (π.χ. Bax, Bad, Bid) και κάποιες άλλες αντι-αποπτωτικές ιδιότητες (π.χ. Bcl-2, Bcl-xL). Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και η Bcl-xL μπορούν να ομο- ή ετερο-διμεριστούν και να δημιουργήσουν πόρους, με αποτέλεσμα να δρουν ως δίαυλοι για ιόντα ή μικρές πρωτεΐνες, τα οποία με αυτόν τον τρόπο μπορούν διαπερνούν την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτόματα, συνεπάγεται ότι οι πρωτεΐνες Bcl-2 και η Bcl-xL οι οποίες βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης μπορούν να αποτρέψουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και ως εκ τούτου, να προστατεύουν τα κύτταρα από το θάνατο²⁷⁷. Ο σχηματισμός διμερών από τις παραπάνω πρωτεΐνες και η μετατόπιση της ισορροπίας ανάμεσα στα προαποπτωτικά μέλη και τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να καθορίζουν την ευαισθησία του κυττάρου ως προς τα αποπτωτικά ερεθίσματα²⁷⁸⁻

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει σχεδόν μονοπωλήσει μια νέα ομάδα πρωτεϊνικών μορίων τα οποία προσδένονται στις πρωτεΐνες Bcl-2 και ρυθμίζουν τη δραστικότητά τους. Στην ομάδα αυτή ανήκει η οικογένεια των πρωτεϊνών BAG η οποία αριθμεί έξι μέλη στον ανθρώπινο οργανισμό και εκδηλώνει αντιαποπτωτική δράση²⁸². Επίσης νευροπροστατευτική δράση εμφανίζει ο διλειτουργικός ρυθμιστής απόπτωσης (bifunctional apoptosis regulator, BAR), μια πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει την απόπτωση η οποία προκαλείται και από τους υποδοχείς "θανάτου" TNF (εξωκυτταρικό μονοπάτι), αλλά και από τα μιτοχόνδρια (ενδοκυτταρικό μονοπάτι). Αυτό επιτυγχάνεται εξαιτίας μιας δομικής περιοχής της πρωτεΐνης BAR η οποία είναι παρόμοια με τις κλασικές τελεστικές περιοχές θανάτου (pseudo-DEDs). Για αυτό το λόγο, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη θεωρείται ως πρότυπη, αφού "γεφυρώνει" συστατικά του εξωκυτταρικού και ενδοκυτταρικού αποπτωτικού μονοπατιού. Η πρωτεΐνη BAR εκφράζεται στους νευρώνες και προωθεί την επιβίωση μετά από αναστρέψιμα αποπτωτικά ερεθίσματα²⁸³. Τέλος, η πρωτεΐνη BI-1 (Bax αναστολέας-1)²⁸⁴, με έξι διαμεμβρανικές δομικές περιοχές, έχει αναδειχθεί ισχυρός αντι-αποπτωτικός δείκτης σε φυτά και πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε ως εξέχον αντιγόνο στα ανθρώπινα γλοιώματα²⁸⁵. Ωστόσο, η λειτουργία της στους νευρώνες δεν έχει αποσαφηνισθεί ακόμα²⁸².

1.13.3.4 Αποπτωτικά μονοπάτια

Τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια είναι δύο και μπορούν να διαφοροποιηθούν λόγω της χρονικής συσχέτισης της ενεργοποίησης των κασπασών και της μιτοχονδριακής αποδέσμευσης του κυτοχρώματος C. Στο πρώτο μονοπάτι, όπου η απόπτωση γίνεται μέσω των λεγόμενων υποδοχέων «θανάτου» (death receptors, DR), ενεργοποιείται μια κασπάση πριν από τις μιτοχονδριακές μεταβολές. Στη δεύτερη περίπτωση, όπου μεσολαβούν τα μιτοχόνδρια, το

κυτόχρωμα C αποδεσμεύεται από το μιτοχονδριακό μεσομεβρανικό διάστημα πριν την ενεργοποίηση της κασπάσης.

Απόπτωση μέσω υποδοχέων "θανάτου". Οι υποδοχείς "θανάτου" (death receptors, DR) είναι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι οποίοι προκαλούν την απόπτωση. Ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF (tumor necrosis factor). Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται από μια εξωκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή που ογδόντα αμινοξέων. Αυτή είναι γνωστή ως "περιοχή θανάτου" (death domain, DD) και αναγνωρίζεται από αντίστοιχες περιοχές των πρωτεϊνών-προσαρμοστών (FADD, TRADD, RIP1, DAXX), οι οποίες μέσω πρόσδεσής τους στους υποδοχείς εκκινούν την απόπτωση. Σε γενικές γραμμές, οι υποδοχείς δεσμεύουν ένα ή περισσότερα είδη προσδετών οι οποίοι εκφράζονται από τα γειτονικά κύτταρα. Η δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα προκαλεί τον τριμερισμό του υποδοχέα πολλοί διαφορετικοί τύποι υποδοχέων "θανάτου" σε διαφορετικούς ιστούς (Fas ή CD95, TNFR1, DR3, DR4, DR5, DR6). Ωστόσο, μόνο δύο

1) Υποδοχέας Fas (Σχήμα 1.27). Η ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων συμβαίνει κατά τη διάρκεια μιας προσαρμοσμένης ανοσολογικής απάντησης σε μια μόλυνση και αυτός είναι ένας από τους κύριους ρόλους του υποδοχέα Fas. Κατά την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του προσδέτη Fas (Fas-L). Ενώ αρχικά τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα είναι ανθεκτικά στην Fas-προκαλούμενη απόπτωση, κατά την πορεία της μόλυνσης, γίνονται προοδευτικά πιο ευαίσθητα στην Fas-προκαλούμενη απόπτωση. Ο προσδέτης Fas-L συνδέεται με τον υποδοχέα Fas με αυτοπαρακρινικό ή παρακρινικό τρόπο. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενεργοποιεί τη σηματοδότηση της προκασπάσης-8, η οποία κατόπιν ενεργοποιεί την κασπάση-3 και τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση²⁸⁶.

Σε κλασικά παραδείγματα τροφικής στέρησης σε καλλιέργειες κυττάρων PC12, CGCs και κινητικών νευρώνων νωτιαίου μυελού, η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του Fas-L/Fas παραπέμπει σε μείωση του κυτταρικού θανάτου. Άρα, η ενεργοποίηση του Fas είναι ένα υποχρεωτικό βήμα για τον παράγοντα τροφικής στέρησης ο οποίος μειώνει την απόπτωση²⁸⁷.

2) Νευροτροφικός υποδοχέας p75^{NTR}. Ο p75^{NTR} ήταν ο μόνος γνωστός υποδοχέας για το νευροαυξητικό παράγοντα NGF. Περιέχει μια τροποποιημένη περιοχή θανάτου²⁸⁸ και ενεργοποιείται υπό ειδικές συνθήκες, οπότε και επιφέρει απόπτωση στους νευρώνες²⁸⁹. Τα πρώτα αποτελέσματα για την αποπτωτική του δράση προήλθαν από *in vitro* μελέτες σε καλλιέργειες νευρωνικών κυττάρων²⁹⁰. Όμως, ακόμα και σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος του στην απόπτωση, ενώ είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι ενήλικοι νευρώνες δεν εκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα^{291,292}.



Σχήμα 1.27: Απεικόνιση του τρόπου δράσης του υποδοχέα Fas²⁹³.

Απόπτωση μέσω μιτοχονδρίων. Η μιτοχονδριακή απόπτωση στους νευρώνες μπορεί να γίνει μέσω πολλών παραγόντων, υποδηλώνοντας ότι στη μείωση της απόπτωσης εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί. Πειραματικά δεδομένα αποκάλυψαν ότι το βασικό στάδιο στο μονοπάτι αυτό είναι η αποδέσμευση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, λόγω ρήξης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ή/και λόγω μιτοχονδριακής διαπερατότητας μετάπτωσης (MPT), η οποία ελέγχεται από ένα πόρο ευαίσθητο στο δυναμικό και στα ιόντα ασβεστίου²⁸⁶. Στα αρχικά στάδια της απόπτωσης, παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια, όπως ελάττωση του μεγέθους τους και συμπύκνωση της θεμέλιας ουσίας τους, οι οποίες συχνά αναφέρονται ως μιτοχονδριακή πύκνωση. Με την απώλεια του κυτοχρώματος C, τα μιτοχόνδρια συσσωρεύονται γύρω από τον πυρήνα, γεγονός στενά συνδεδεμένο με την παραγωγή της πρωτεΐνης Bax, μέλος της οικογένειας Bcl-2.

Όπως, επισημάνθηκε, πολλά σήματα θανάτου συγκλίνουν στα μιτοχόνδρια και σε όλα συμμετέχουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 οι οποίες στρατολογούνται από διαφορετικά μονοπάτια. Τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας των Bcl-2 (Bcl-2 και Bcl-xL) βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, ενώ τα προαποπτωτικά μέλη (Bad, Bax, Bid) μπορεί να βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα είτε στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου²⁷⁶. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 από τον υποδοχεά Fas προκαλεί τη διάσπαση της πρωτεΐνης Bid, το C-τελικό τμήμα της οποίας (tBid) μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια. Στα οργανίδια αυτά, το tBid ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Bax, η οποία με τη σειρά της απελευθερώνει το κυτόχρωμα C. Σημειωτέον ότι το tBid μπορεί και από μόνο του να προκαλέσει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Αντίθετα, οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL εργάζονται για να προλάβουν την αποδέσμευση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και επομένως, να προστατεύσουν τα κύτταρα από το θάνατο²⁹⁴. Το κυτόχρωμα C επάγει το σχηματισμό του αποπτοσώματος, όπου πραγματοποιείται αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 στην ώριμη μορφή της, η οποία ακολούθως ενεργοποιεί τον καταρράκτη κασπασών των κασπασών τελεστών-3, -6 και -7.

Το Σχήμα 1.28 αναπαριστά το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω μιτοχονδρίων.



Σχήμα 1.28: Απεικόνιση του ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού της απόπτωσης²⁹⁵.

Ερεθίσματα ανεξάρτητα από τους υποδοχείς θανάτου μπορούν επίσης να προκαλέσουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C μέσω της μετακίνησης της πρωτεΐνης Bax ή Bad στα μιτοχόνδρια. Στα υγιή κύτταρα, η Bad μπορεί να φωσφορυλιωθεί ως απάντηση σε παράγοντες επιβίωσης από διάφορες κινάσες (π.χ. Akt, ERK, PKA, PAK). Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, η Bad αποφωσφορυλιώνεται και μετακινείται προς τα μιτοχόνδρια, όπου συνδέεται με την Bcl-xL, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η αντι-αποπτωτική δραστηριότητα της τελευταίας.

Άλλη μια πρωτεΐνη η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στο μεσομεμβρανικό διάστημα των μιτοχονδρίων είναι ο παράγοντας πρόκλησης απόπτωσης (AIF). Ο AIF είναι μια φλαβοπρωτεΐνη, η οποία έχει την ίδια ομολογία με τη βακτηριακή οξειδοαναγωγάση και είναι παρόμοια με το κυτόχρωμα C. Με την επαγωγή του σήματος θανάτου, υπερέκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 συνεπάγεται αποδέσμευση του AIF από τα μιτοχόνδρια και μεταφορά του στον πυρήνα, όπου προσδένεται στο DNA και προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης και κατάτμηση του DNA με τρόπο ανεξάρτητο των κασπασών²⁹⁶.

Πρόσφατα μια επιπλέον πρωτεΐνη, η Smac/DIABLO, βρέθηκε ότι απελεθερώνεται μαζί με το κυτόχρωμα C κατά την απόπτωση^{297,298}. Η πρωτεΐνη Smac/DIABLO ενισχύει την ενεργοποίηση των κασπασών μέσω συσχέτισης με το αποπτώσωμα και αναστέλλει μια οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες δρουν ως αναστολείς της απόπτωσης (IAPs).

1.14 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους παράγοντες που επάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε νευρικά κύτταρα. Το γλουταμικό οξύ φαίνεται να προκαλεί το θάνατο των νευρωνικών κυττάρων και σχετίζεται με ποικίλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καθώς επίσης και με οξέα τραύματα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έχουν περιγραφεί δύο βασικά μονοπάτια για την τοξικότητα του γλουταμικού οξέος.

Το "κλασσικό" ή διατοξικό μονοπάτι πραγματοποιείται μέσω των ιονοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού οξέος²⁹⁹. Η παροδική ροή ιόντων ασβεστίου η οποία ξεκινά από αυτούς τους υποδοχείς οδηγεί σε θανατηφόρα αλλαγή της ομοιόστασης του ασβεστίου, αυξάνει τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τελικά, καταλήγει στον κυτταρικό θάνατο. Αυτό το μονοπάτι χαρακτηρίζεται από την αναστολή του από ειδικούς ανταγωνιστές του υποδοχέα του γλουταμικού οξέος.

Από μελέτες οι οποίες αφορούσαν στους γλουταμινεργικούς υποδοχείς, τους ανταγωνιστές και τον κυτταρικό θάνατο, έγινε εμφανής η ύπαρξη ενός δεύτερου μονοπατιού της τοξικότητας του γλουταμικού οξέος. Σε αυτήν την περίπτωση, δεν εμπλέκονται οι υποδοχείς οι οποίοι προαναφέρθηκαν, αλλά ένας αντιμεταφορέας γλουταμικού οξέος/κυστίνης ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μεταφορά της κυστίνης εντός των νευρώνων³⁰⁰. Η αναστολή της πρόσληψης της κυστίνης από υψηλές συγκεντρώσεις εξωκυττάριου γλουταμικού οξέος επάγει

διαφορά της ομοιόστασης της κυτταρικής κυστεΐνης, μείωση των επιπέδων της κυτταρικής γλουταθειόνης, συσσώρευση των ROS και συνεπώς, κυτταρικό θάνατο. Αλλαγές της ομοιόστασης του ασβεστίου παρόμοιες με εκείνες οι οποίες παρατηρούνται από υπέρμετρη διέγερση των γλουταμικών υποδοχέων είναι τυπικές του οξειδωτικού αυτού μονοπατιού^{300,301}.

Φυσικά, ο θάνατος των νευρωνικών κυττάρων μέσω του οξειδωτικού μονοπατιού μπορεί να ανασταλεί από αντιοξειδωτικά^{81,300} ή από υψηλές συγκεντρώσεις εξωκυττάριας κυστίνης. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε κυτταρικές σειρές νευρώνων και ολιγοδενδροκυττάρων. Το οξειδωτικό μονοπάτι της τοξικότητας του γλουταμικού οξέος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και ως μοντέλο μελέτης της απόκρισης των νευρωνικών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες.

Σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα, ο κυτταρικός θάνατος μέσω του οξειδωτικού μονοπατιού προτείνει έναν καθοριστικό ρόλο για τη δραστικότητα της οξειδάσης σχετικά με τη δημιουργία των ROS⁸¹. Επιπρόσθετα, ο ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης C — ο 13-οξικός εστέρας της 12-Ο-τετραδεκανοϋλοφορβόλης (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, TPA) — προστατεύει τα κύτταρα από το θάνατο μέσω του οξειδωτικού μονοπατιού. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι στον κυτταρικό θάνατο μέσω του οξειδωτικού μονοπατιού μπορεί να συμμετέχει η απόπτωση, γιατί η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C εμποδίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε πολλές μη νευρωνικές κυτταρικές σειρές. Ο τύπος του κυτταρικού θανάτου μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων του γλουταμικού οξέος είναι αμφιλεγόμενος, αλλά σε πολλά μοντέλα φαίνεται να εμφανίζει χαρακτηριστικά της νέκρωσης.

1.15 Νευροπροστασία

Μία από τις σπουδαιότερες ιδιότητες των νευροστεροειδών είναι η αντιαποπτωτική τους επίδραση στους νευρώνες. Η απόπτωση είναι το καταληκτικό σημείο πολλών νευρολογικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των νόσων Alzheimer's, Parkinson και Huntington, του εγκεφαλικού επεισοδίου/τραύματος, της πολλαπλής και αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (ALS)³⁰²⁻³⁰⁷. Επιπλέον, η

απόπτωση των νευρώνων θεωρείται ο κύριος παράγοντας ο οποίος συμβάλει στην ατροφία του εγκεφάλου λόγω γήρανσης³⁰³.

Το *Ν*-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ επάγει απόπτωση των νευρώνων μιμούμενο τη δράση του γλουταμικού οξέος στους υποδοχείς NMDA³⁰⁸. Ενεργοποίηση των υποδοχέων συνεπάγεται ταχεία εισροή ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και διέγερση της συνθετάσης νιτρικού οξέος η οποία οδηγεί σε NMDA-επαγόμενη τοξικότητα. Η αλλοστερική τροποποίηση των υποδοχέων NMDA από την αλλοπρεγνανολόνη αναστέλλει το παραπάνω μονοπάτι και προστατεύει τους νευρώνες από την απόπτωση μετά από ισχαιμία. Επίσης, σε καλλιέργειες ιππόκαμπου η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο θειϊκός εστέρας της μειώνουν τις νευροτοξικές δράσεις του Ν-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος (in vitro και in vivo), του καϊνικού οξέος και του 2-αμινο-3-(5-μεθυλο-3-οξο-1,2-οξαζολο-4-)προπιονικού οξέος (AMPA) (in vitro)^{309,310}. Χορήγηση δεϋδροεπιανδροστερόνης σε νευρώνες ιππόκαμπου CA1/2, ώστε τα επίπεδα του νευροστεροειδούς στο πλάσμα να αντιστοιχούν σε αυτά τα οποία απαντώνται σε νεαρούς ενήλικες, προστατεύει τα κύτταρα από νευροτοξικότητα λόγω γλουταμικού και Ν-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος. Τέλος, και το συνθετικό νευροστεροειδές ημιηλεκτριμιδεστέρας της 3αυδροξυ-56-πρεγναν-20-όνης (ABHS) εκδηλώνει παρόμοια προστατευτική δράση σε καλλιέργειες των προαναφερόμενων νευρώνων ως ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA. Για αυτό το λόγο, το συνθετικό αυτό νευροστεροειδές προτάθηκε για χρήση στη θεραπεία ισχαιμικών βλαβών προκαλούμενων από εγκεφαλικά επεισόδια ή από νευροεκφυλιστικά σύνδρομα του νωτιαίου μυελού³¹¹.

Επίσης, η αλλοστερική ρύθμιση των υποδοχέων GABA_A από τη δεϋδροεπιανδροστερόνη και την αλλοπρεγνανολόνη είναι δυνατόν να οδηγεί στην προστασία των νευρώνων. Αυτό επιτυγχάνεται με την αναστολή των προαποπτωτικών τελεστών κυτόχρωμα C και Bax, η οποία παρεμποδίζει την επαγόμενη από το N-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ διεγερσιμοτοξικότητα^{312,313}.

Η νευροπροστατευτική δράση της δεϋδροεπιανδροστερόνης και του θειϊκού της εστέρα εκδηλώνεται και μέσω αλληλεπίδρασής τους με εξειδικευμένες μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης. Σε καλλιέργειες κυττάρων PC12 νευρικής ακρολοφίας τα οποία δεν εκφράζουν τους υποδοχείς NMDA και GABA_A και υπό συνθήκες στέρησης ορού, τα προαναφερόμενα νευροστεροειδή προσδένονται σε

στις εξειδικευμένες αυτές μεμβρανικές θέσεις με υψηλή συγγένεια (D_d = 0.9 nM) και προστατεύουν αποτελεσματικά τα κύτταρα από την απόπτωση³¹⁴. Από τα πειράματα προκύπτει ότι αυτές οι θέσεις πρόσδεσης χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τη δεϋδροεπιανδροστερόνη και 3*β*-OH-Δ⁵-ανδροστένια, ενώ αντίστοιχες θέσεις έχουν εντοπισθεί και σε κύτταρα ιππόκαμπου επίμυος³¹⁵.

Η αντιαποπτωτική δράση των νευροστεροειδών φαίνεται ότι προκαλείται από την ενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών των νευρώνων. Όντως, η δεϋδροεπιανδροστερόνη και η αλλοπρεγνανολόνη ελέγχουν τη μεταγραφή των γονιδίων των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL, ενεργοποιώντας τους παράγοντες CREB και NF-κB της αντιαποπτωτικής μεταγραφής^{314,315}. Επιπρόσθετα, τόσο η αλλοπρεγνανολόνη, όσο και η προγεστερόνη καταστέλλουν την έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών κασπάση-3 και Bax σε περιπτώσεις τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης. Κατά αυτόν τον τρόπο, δρουν αντιαποπτωτικά και ταυτόχρονα ελαχιστοποιούν το εύρος της τοπικής φλεγμονής, καταστέλλοντας τα προφλεγμονώδη αστροκύτταρα τα οποία την προκάλεσαν, με αποτέλεσμα να επιδρούν ευεργετικά στη νόηση³¹⁶.

Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι τα γλυκοκορτικοειδή και η τεστοστερόνη αλληλεπιδρούν με τις DHEA-εξειδικευμένες μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης, δρώντας ως ανταγωνιστές της δεϋδροεπιανδροστερόνης και παρεμποδίζοντας την αντιαποπτωτική της επίδραση³¹⁵. Η βαθμιαία μείωση των επιπέδων της δεϋδροεπιανδροστερόνης κατά τη γήρανση, καθώς και σε ασθενείς πάσχοντες από τη νόσο Alzheimer's σε συνδυασμό με τη νευροτοξικότητα μέσω γλυκοκορτικοειδών θα μπορούσε να οξύνει την ήδη δηλητηριώδη επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων κορτιζόλης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και να καταστήσει τους νευρώνες περισσότερο ευπαθείς στην τοξικότητα η οποία προκαλείται από γλυκοκορτικοειδή και ανδρογόνα^{317,318}.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</u>

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΡΥΛΑΛΚΥΝΥΛΟΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ

Πρόσφατες αναφορές στη βιβλιογραφία έχουν εστιασθεί στην επίδραση αναλόγων της πρεγνενολόνης σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Οι μελέτες αυτές επικεντρώνονται στη σύνθεση στεροειδών τα οποία φέρουν ετεροκυκλικές δομές. Έχει δειχθεί ότι η ενσωμάτωση ετεροκυκλικών συστημάτων, αποτελούμενων κυρίως από άτομα N ή O, στο στεροειδικό σκελετό βελτιώνει τις φαρμακολογικές και βιολογικές ιδιότητες των στεροειδών (π.χ. αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, διουρητικές κ.τ.λ.), ενώ οδηγεί επίσης σε μη τοξικά στεροειδή τα οποία διαπερνούν εύκολα την κυτταρική μεμβράνη.

Ειδικότερα, οι πυραζολίνες είναι μία από τις ενδιαφέρουσες ομάδες ετεροκυκλικών ενώσεων, δεδομένου ότι παρουσιάζουν σημαντική αναλγητική, αντιπυρετική, αντιανδρογονική, αντικαταθλιπτική και αντιρευματική δράση, ενώ ως ετεροκυκλικά συστήματα αζώτου διαθέτουν επίσης αντιπαρκινσονικές και αντικαρκινικές ιδιότητες³¹⁹. Επιπρόσθετα, η εισαγωγή των βασικών και υδροφιλικών αζολίων στη δομή των στεροειδών μπορεί να μεταβάλει τη βιολογική δράση τους. Τα στεροειδικά αζόλια μπορούν να αλληλεπιδρούν με διάφορα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των στεροειδών (π.χ. κυτόχρωμα P450). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ανδρογόνα εμπλέκονται στην αιτιολογία διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος του προστάτη, καθίσταται σαφές ότι αναστολείς αυτών των ενζύμων μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα εργαλεία στην αντιμετώπιση ανδρογονοεξαρτώμενων ασθενειών. Παραδειγματικά αναφέρεται ότι τα στεροειδικά αζόλια είναι αναστολείς των 5-αναγωγασών και άρα, θεωρούνται πολλά υποσχόμενες ενώσεις εναντίον διαφόρων τύπων καρκίνου³²⁰.

Πιο συγκεκριμένα, ο Banday και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν τη σύνθεση 21-(1,2,3-τριαζολ-1-υλο)παραγώγων της πρεγνενολόνης και 17-πυραζολινυλοπαραγώγων της ανδροστενόλης (Σχήμα **2.1**, γενική δομή **A** και **B**, αντίστοιχα), των οποίων η αντικαρκινική δραστικότητα αξιολογήθηκε σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (DU145, PC3, SF295, HCT15, 502713, HEP2, A549, HT29, HOP62,

A545, MCF7). Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι τα νέα αυτά ανάλογα εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξική δράση σε εύρος συγκεντρώσεων 0.03-50.6 μM^{319,320}.



Σχήμα 2.1: Γενική δομή **(A)** 21-τριαζολυλοπαραγώγων της πρεγνενολόνης και **(B)** 17πυραζολινυλοπαραγώγων της ανδροστενόλης.

Με βάση τα παραπάνω, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής σχεδιαάσθηκαν και συντέθηκαν αρυλαλκυνυλοανάλογα της πρεγνενολόνης, τα οποία συνοψίζονται στον Πίνακα **2.1**. Ο σχεδιασμός περιλαμβάνει την παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 3*θ*, ενώ υποκαταστάτης του 20-καρβονυλίου είναι διάφορες αρυλαλκυνυλομάδες. Για τη λήψη σχέσεων δομής-δράσης μελετήθηκε η υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου. Συγκεκριμένα, εισήχθηκε η μεθοξυομάδα σε π-θέση, η οποία ως δέκτης πρωτονίου συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου (**5**γ), καθώς επίσης και σε συνδυασμό με την ηλεκτρονιοδοτική μεθυλομάδα σε *μ*θέση (**5**η), η φθορομάδα η οποία είναι ηλεκτρονιοδεκτική σε *μ*- και π-θέση (**5α** και **εξ**, αντίστοιχα), καθώς επίσης και συνδυασμός φθορο-υποκαταστάτη σε π-θέση και μεθυλομάδας σε *μ*-θέση (**5**β), η ηλεκτρονιοελκτική τριφθορομεθυλομάδα σε *ο*- και μ-θέση (**5ε** και **5στ**, αντίστοιχα) και αλκυνυλομάδα σε *μ*-θέση (**5θ**). Τέλος, το ανάλογο **5δ** περιέχει 2,4,5-τριμεθυλοφαινυλο-υποκαταστάτη.

Οι ενώσεις αυτές αναμένεται να έχουν περιορισμένους βαθμούς ελευθερίας, γεγονός το οποίο αποδίδεται στην παρουσία αφενός της γραμμικής με

υβριδισμό *sp* αιθυνυλικής ομάδας και αφετέρου, του επίπεδου αρωματικού δακτυλίου.



Πίνακας 2.1: Αρυλαλκυνυλοανάλογα της πρεγνενολόνης.



Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) t-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοχλωρίδιο, ιμιδαζόλιο, διμεθυλοφορμαμίδιο, 50 °C
- (ii) Υποβρωμιώδες νάτριο, διοξάνιο-νερό, ϑ.π.

- (iii) Υδροχλωρικό αλάτι της Ν,Ο-διμεθυλοϋδροξυλαμίνης, 4-διμεθυλαμινοπυριδίνη,
 υδροχλωρικό αλάτι του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιϊμιδίου,
 διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (iv) **Μέθοδος Α**: n-βουτυλολίθιο, αρυλαλκύνιο, τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη, τετραϋδροφουράνιο, -40 °C
- (v) Μέθοδος Β: n-βουτυλολίθιο, αρυλαλκύνιο, τετραϋδροφουράνιο, -40 °C
- (vi) Υδροφθορική πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο, θ.π.

Στο Σχήμα **2.2** περιγράφεται η πορεία η οποία ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των αναλόγων **5α-θ**. Προστασία της πρεγνενολόνης στην 3*θ*-θέση με *t*-βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοχλωρίδιο παρουσία ιμιδαζολίου σε διμεθυλοφορμαμίδιο έδωσε την κετόνη **1**³²¹⁻³²³, η οποία με αλοφορμική αντίδραση έδωσε το αντίστοιχο 17*θ*-καρβοξυλικό οξύ **2**³²⁴. Το τελευταίο ενεργοποιήθηκε με χρήση υδροχλωρικού άλατος του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιϊμιδίου και στη συνέχεια, αντέδρασε με το υδροχλωρικό αλάτι της *N*,*O*-διμεθυλο-υδροξυλαμίνης παρουσία βάσης σε διχλωρομεθάνιο, για να οδηγήσει στο αντίστοιχο *N*,*O*-διμεθυλυδροξαμικό οξύ **3**, γνωστό και ως αμίδιο Weinreb³²⁵. Στο Σχήμα **2.3** περιγράφεται ο μηχανισμός σχηματισμού του αμιδίου Weinreb.



Σχήμα 2.3: Μηχανισμός σχηματισμού αμιδίου Weinreb.

Στην Εικόνα **2.1** παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου του αμιδίου Weinreb **3**. Χαρακτηριστικές είναι οι απλές κορυφές στα 3.19 και 3.63 ppm οι οποίες ανήκουν στα πρωτόνια των ομάδων OCH₃ και NCH₃, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.1: ¹Η NMR της ένωσης **3**.

Στη συνέχεια, επίδραση *n*-βουτυλολιθίου στους 0°C στο 1-αιθυνυλο-4μεθοξυβενζόλιο, 1-αιθυνυλο-2-τριφθορομεθυλοβενζόλιο, 1-αιθυνυλο-3τριφθορομεθυλοβενζόλιο και 1-αιθυνυλο-4-φθοροβενζόλιο οδήγησε στα αντίστοιχα ακετυλενίδια, τα οποία προσέβαλαν τον καρβονυλικό άνθρακα του αμιδίου Weinreb **3** και ελήφθησαν οι υποκατεστημένες ακετυλενικές κετόνες **4γ**, **4ε**, **4στ** και **4ζ**. Για το σχηματισμό των κετονών **4α**, **4β**, **4δ**, **4η** και **4θ** απαιτείται επιπρόσθετα η χρήση τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TMEDA). Το συμπλεκτικό αυτό μέσο έδωσε βελτιστοποιημένες αποδόσεις για τις παραπάνω κετόνες, δεδομένου ότι χρησιμεύει για τη σταθεροποίηση του ακετυλενιδίου το οποίο προκύπτει, σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης που απεικονίζεται στο Σχήμα **2.4**.



Σχήμα 2.4: Μηχανισμός σχηματισμού υποκατεστημένων ακετυλενικών κετονών.

Στην Εικόνα **2.2** παρατίθενται τα φάσματα πρωτονίου και άνθρακα για την ένωση **4γ**. Στο φάσμα πρωτονίου χαρακτηριστική είναι η κορυφή της μεθοξυομάδας στα 3.84 ppm, ενώ στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές, καθεμία από τις οποίες ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, στα 6.88 και 7.51 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια του *π*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Στο φάσμα ¹³C NMR παρατηρούνται οι κορυφές στα 89.1 και 92.1 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στους άνθρακες του τριπλού δεσμού. **Εικόνα 2.2:** ¹Η NMR της ένωσης **4γ**.


Το τελευταίο στάδιο περιλάμβανε την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας από την 36-θέση με την επίδραση υδροφθορικής πυριδίνης σε διχλωρομεθάνιο, οδηγώντας στα επιθυμητά αρυλαλκυνυλοανάλογα 5α-θ. Η χρήση του συγκεκριμένου αντιδραστηρίου για την αποπροστασία στηρίζεται στο γεγονός ότι ο δεσμός πυριτίου-φθορίου είναι σημαντικά ισχυρότερος από το δεσμό οξυγόνου-φθορίου³²⁶. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι όταν για την αποπροστασία χρησιμοποιήθηκε φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο, οι αποδόσεις ήταν χαμηλότερες. Αντιθέτως, η υδροφθορική πυριδίνη είναι ένα αντιδραστήριο μη βασικό, με αποτέλεσμα να μην προκαλεί την απόσπαση πρωτονίων από το προστατευμένο υπόστρωμα και συνεπώς, να μην οδηγεί στη διάσπασή του. Ο μηχανισμός της αντίδρασης αποπροστασίας περιγράφεται στο Σχήμα 2.5.



Σχήμα 2.5: Μηχανισμός απομάκρυνσης της t-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλομάδας με τη χρήση υδροφθορικής πυριδίνης.

Στην Εικόνα **2.3** παρατίθενται χαρακτηριστικά τα φάσματα πρωτονίου και άνθρακα της τελικής ένωσης **5γ**. Όσον αφορά στο φάσμα πρωτονίου, παρατηρείται η εξαφάνιση των κορυφών της προστατευτικής ομάδας, ενώ στα 6.90 και 7.52 ppm εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές, με ολοκλήρωση δύο πρωτονίων η καθεμία, οι οποίες αντιστοιχούν τα πρωτόνια του υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Στο φάσμα ¹³C NMR εμφανίζονται οι κορυφές στα 89.2 και 92.2 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στους άνθρακες του τριπλού δεσμού. Στα 189.0 ppm συντονίζεται το ανθρακοάτομο της καρβονυλομάδας, ενώ ο άνθρακας της μεθοξυ-ομάδας συντονίζεται στα 64.8 ppm και ο 3-C στα 71.7 ppm.

Εικόνα 2.3: ¹Η NMR της ένωσης 5γ.



¹³C NMR



<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</u>

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ C17-ΣΠΕΙΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΔΕΫΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

Η έλλειψη αποτελεσματικής αντιμετώπισης διαφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως οι νόσοι Huntington (HD), Alzheimer's (AD) και Parkinson (PD), έχει εγείρει το ενδιαφέρον των ερευνητών, με αποτέλεσμα να γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη προστατευτικών μέσων, τα οποία είτε παρεμποδίζουν είτε θεραπεύουν την προοδευτική απώλεια της νευρωνικής λειτουργίας. Συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάγκη σύνθεσης νέων ενώσεων για την επιβίωση και την προστασία των νευρώνων από την απόπτωση, για την επιδιόρθωση των νευρικών κυττάρων, αλλά και για τη νευρογένεση.

Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν τον πιθανό νευροπροστατευτικό ρόλο των νευροστεροειδών σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Φυσικά νευροστεροειδή, όπως η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), εμφανίζουν έντονη νευροπροστατευτική και νευρογενή δράση *in vitro* και *in vivo*²⁵⁰. Ωστόσο, αυτά τα νευροστεροειδή μεταβολίζονται στον άνθρωπο σε οιστρογόνα, ανδρογόνα ή προγεστογόνα, τα οποία είναι γνωστό ότι εκδηλώνουν σημαντικές ενδοκρινικές παρενέργειες — συμπεριλαμβανομένου της ορμονοεξαρτώμενης νεοπλασίας¹⁴ οι οποίες περιορίζουν την κλινική τους χρήση.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και σε συνέχεια μελετών επί των νευροδραστικών στεροειδών από την ομάδα μας^{105,327}, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν 17-σπειροκυκλικά αναλόγα της δεϋδροεπιανδροστερόνης, με στόχο τη διερεύνηση των στερεοηλεκτρονικών απαιτήσεων για βέλτιστη αντιαποπτωτικήνευροπροστατευτική δράση και την απουσία ορμονικών παρενεργειών. Το σκεπτικό σχεδιασμού βασίστηκε του στο γεγονός ότι n C17 θέση της δεϋδροεπιανδροστερόνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολικό μετασχηματισμό της σε ανδρογόνα και οιστρογόνα, ενώ η 38-υδροξυλομάδα θεωρείται απαραίτητη για την εκδήλωση νευροπροστατευτικής δράσης³²⁸.

Πιο συγκεκριμένα, συντέθηκαν δύο σειρές αναλόγων. Η πρώτη σειρά περιλαμβάνει τα 17-σπειρο-οξιρανικά παράγωγα **6**, **9**, και **13** και το 17-

111

σπειροκυκλοπροπανικό ανάλογο 28 (Πίνακας 3.1). Η επιλογή της εποξυ- και της κυκλοπροπυλομάδας ως υποκαταστατών στην 17-θέση έγινε με γνώμονα το σχετικά μικρό μέγεθός τους, το οποίο επιτρέπει την πιθανή πρόσδεση των νέων αναλόγων στις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης, και τη σχετικά μικρή δραστικότητά τους σε αντιδράσεις αλκυλίωσης. Στο ανάλογο 6, το σπειροεποξείδιο στη θέση C17 δεν είναι υποκατεστημένο, σε αντίθεση με τις διαστερεοϊσομερείς ενώσεις 9 και 13 οι οποίες φέρουν στη θέση C20 υδροξυμεθυλομάδα. Η τελευταία έχει τη δυνατότητα να συμμετάσχει σε δεσμούς υδρογόνου και επομένως, πιθανόν να ενισχύει την αλληλεπίδραση των συνθετικών νευροστεροειδών με τις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης^{328,329}. Αντίστοιχα είναι υποκατεστημένο και το κυκλοπροπανικό ανάλογο 28.



Πίνακας 3.1: 17-Σπειροκυκλικά ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης.

Σχήμα 3.1: Σύνθεση της ένωσης **6**.



<u>Αντιδραστήρια και συνθήκες</u>:

(i) t-Bουτοξυκάλιο, ιωδιούχο τριμεθυλοσουλφώνιο, διμεθυλοφορμαμίδιο, θ.π.

Στο Σχήμα **3.1** περιγράφεται η πορεία η οποία ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης **6**, η οποία παρασκευάσθηκε σε ένα μόνο στάδιο από την εμπορικά διαθέσιμη δεϋδροεπιανδροστερόνη, ακολουθώντας τη μέθοδο Corey-Chaykovsky³³⁰. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση της βάσης με το ιωδιούχο τριμεθυλοσουλφώνιο στους 0°C οδήγησε στο υλίδιο του θείου, το οποίο προσέβαλε το καρβονύλιο στη θέση C17. Από την αντίδραση ελήφθη αποκλειστικά το ένα επιμερές προϊόν της C17-θέσης, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η πυρηνόφιλη προσθήκη λαμβάνει χώρα μόνο από τη μία πλευρά του επιπέδου του καρβονυλίου, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης του μεθυλίου του C18, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα **3.2**. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα πρωτονίου της ένωσης **6** (Εικόνα **3.1**), όπου οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του εποξειδικού δακτυλίου συμφωνούν με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα για ανάλογες ενώσεις³³¹.



Σχήμα 3.2: Μηχανισμός εποξείδωσης Corey-Chaykovsky.

Εικόνα 3.1: ¹Η NMR της ένωσης **6**.



Σχήμα 3.3: Σύνθεση της ένωσης **9**.



Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) Βινυλομαγνησιοβρωμίδιο, τετραϋδροφουράνιο, ϑ.π.
- (ii) t-Βουτυλοϋδροϋπεροξείδιο, σύμπλοκο ακετυλοακετόνης βαναδυλίου,
 διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (iii) Άνθρακικό κάλιο, μεθανόλη, θ.π.
- (iv) t-Βουτοξυκάλιο, t-βουτανόλη, θ.π.

Όσον αφορά στη σύνθεση του αναλόγου **9**, απαιτήθηκαν μόνο τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε προσθήκη βινυλομαγνησιοβρωμιδίου στο καρβονύλιο της θέσης C17 της δεϋδροεπιανδροστερόνης. Μελετήθηκαν οι πειραματικές συνθήκες για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της αντίδρασης (Πίνακας **3.2**). Οι παράμετροι τις οποίες μεταβάλλαμε περιελάμβαναν διαφορετικές θερμοκρασίες, διαφορετική περίσσεια αντιδραστηρίου βινυλομαγνησιοβρωμιδίου, χρήση καταλύτη (χλωριούχος ψευδάργυρος, ZnCl₂)³³² ή άλατος (τριχλωριούχο δημήτριο, CeCl₃³³³⁻³³⁵), διαφορετικές προστατευτικές ομάδες για την 3*β*υδροξυλομάδα, *in situ* σχηματισμό του αντιδραστηρίου Grignard, χρήση υπερήχων και διαφορετική σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων³³⁶. Το βέλτιστο αποτέλεσμα ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κανονικής προσθήκης (προσθήκη του στεροειδούς στο βινυλομαγνησιοβρωμίδιο) σε θερμοκρασία 0°C με 10 ισοδύναμα βινυλομαγνησιοβρωμιδίου. Σε όλες τις περιπτώσεις, ελήφθη αποκλειστικά η 17*β*-τριτοταγής αλκοόλη, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης από τη C18-μεθυλομάδα.

Πείραμα	Αντιδρόν	Ισοδύναμα βινυλομαγνη- σιοβρωμιδίου (eq)	Θερμοκρασία προσθήκης (°C)	Απόδοση (%)
1	DHEA	5	-78	<u> </u>
2	Ac-DHEA	5	-78	35
3	DHEA	9	0	30
4	Ac-DHEA	15	0	40
5	DHEA	10	0	69
6 ^β	DHEA	15	0	52
7 ^β	Ac-DHEA	20	0	68
8 ^β	DHEA	1.3	0	<u>_</u> α
9 ^β	TBDPS-DHEA	1.5^{γ}	-78	<u>_</u> α
10 ^β	DHEA	6 ^γ	-78	<u>_</u> α
11^β	TBDPS-DHEA	11	0	36
12 ^β	DHEA	11.5^{δ}	θ.π.	38
13^β	DHEA	11.5^{δ}	0	33
14 ^β	TBS-DHEA	15	0	46
15 ^{β,ε}	DHEA	10	0	60
16^{β,ε}	DHEA	2 ^{στ}	0	α
17^{β,ε}	TBS-DHEA	1.5 ^ζ	0	<u>_</u> α

Πίνακας 3.2: Πειραματικές συνθήκες οι οποίες δοκιμάσθηκαν για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης σύνθεσης της 17β-υδροξυ-17α-βινυλο-5-ανδροστεν-3β-όλης.

^αΔε σχηματίζεται προϊόν, ⁶ακολουθείται η μέθοδος της κανονικής προσθήκης: το αντιδρόν προστίθεται στο αντιδραστήριο Grignard, ⁶χρήση ισομοριακής ποσότητας άνυδρου CeCl₃, ^δin situ σχηματισμός βινυλομαγνησιοβρωμιδίου (Mg και CH₂=CHBr), ^εχρήση υπερήχων, ^{στ}εφαρμογή μεθόδου Barbier-Grignard (Zn και CH₂=CHBr), ^ζ in situ σχηματισμός οργανολιθιακού αντιδραστηρίου (Li και CH₂=CHBr).

Το δεύτερο στάδιο περιελάμβανε την εποξείδωση τύπου Sharpless της βινυλικής αλκοόλης **7** με *t*-βουτυλοϋδροϋπεροξείδιο παρουσία καταλυτικής ποσότητας συμπλόκου ακετυλοακετόνης βαναδυλίου σε διχλωρομεθάνιο, οπότε προέκυψε μείγμα των δύο διαστερεοϊσομερών προϊόντων **8α** (20*R*) και **8β** (20*S*) σε αναλογία 2:1, αντίστοιχα. Η αναλογία αυτή ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκαν 3 ισοδύναμα *t*-βουτυλοϋδροϋπεροξειδίου σε συνδυασμό με 4.4% καταλύτη συμπλόκου ακετυλακετόνης του βαναδυλίου σε θερμοκρασία δωματίου. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του εποξειδικού δακτυλίου στα δύο ισομερή προϊόντα συμφωνούν με ανάλογα βιβλιογραφικά δεδομένα³³⁷, όπως φαίνεται και από τη σύγκριση των φασμάτων πρωτονίου μεταξύ του μείγματος **8α** και **8β** και του καθαρού ισομερούς **8β** (Εικόνα **3.2**).



Εικόνα 3.2: ¹Η NMR των ενώσεων **8α** και **86**.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα **3.4**, η μεταβατική κατάσταση **A** προτιμάται από την αντίστοιχη **B** λόγω της σημαντικής στερικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των 20-Η και 12α-Η στη δεύτερη περίπτωση, ευνοώντας έτσι το σχηματισμό του ενός ισομερούς σε περίσσεια³³⁷.



Σχήμα 3.4: Μεταβατικές καταστάσεις οι οποίες μεσολαβούν στο σχηματισμό των διαστερεοϊσομερών **8α** και **86** στην εποξείδωση τύπου Sharpless.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των διαστερεοϊσομερών εποξειδίων **8α** και **8β** δεν κατέστη δυνατός, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε ποικιλία συστημάτων διαλυτών. Συνεπώς, τα δύο εποξείδια χρησιμοποιήθηκαν ως μείγμα στο επόμενο στάδιο, κατά το οποίο με επίδραση ανθρακικού καλίου σε μεθανόλη υπέστη μετάθεση Payne μόνο το εποξείδιο **8α** προς το επιθυμητό ανάλογο **9**. Η δε ένωση **8β** δε μετατέθηκε υπό τις συνθήκες αυτές, αλλά μετά από απομόνωσή της με χρωματογραφία στήλης μετατέθηκε παρουσία *t*-βουτοξυκαλίου σε *t*-βουτανόλη, οδηγώντας στο εποξείδιο **8γ**.

Σχήμα 3.5: Σύνθεση του αναλόγου **13**.



Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) Υδρίδιο του νατρίου, κυανομεθανοφωσφονικός διαιθυλεστέρας, τετραϋδροφουράνιο, βρασμός
- (ii) Διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο, διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (iii) Νατριοβοροϋδρίδιο, ένυδρο χλωριούχο δημήτριο, μεθανόλη, θ.π.
- (iv) 4-Χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ, ανθρακικό κάλιο, διχλωρομεθάνιο, 0 °C

Στο Σχήμα **3.5** περιγράφεται η σύνθεση της ένωσης **13**. Αντίδραση Horner-Emmons στη δεϋδροεπιανδροστερόνη οδήγησε στο νιτρίλιο **10α**. Σε αυτήν την αντίδραση τύπου Wittig, το καρβανιόν το οποίο σχηματίσθηκε από την αντίδραση στους 0°C του κυανομεθανοφωσφονικού διαιθυλεστέρα και της βάσης προσέβαλε με πυρηνόφιλη προσθήκη το καρβονύλιο της κετόνης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του οξυγόνου από την κυανομεθυλενομάδα και την ταυτόχρονη αποβολή του ανιόντος του όξινου φωσφορικού διαιθυλεστέρα (Σχήμα **3.6**).



Σχήμα 3.6: Μηχανισμός αντίδρασης Horner-Emmons.

Η αντίδραση με επίδραση *t*-βουτοξυκαλίου και κυανομεθανοφωσφονικού διαιθυλεστέρα σε τετραϋδροφουράνιο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οδήγησε σε μείγμα των (*E*)- και (*Z*)-ισομερών **10α** και **10β** σε αναλογία 5:1, αντίστοιχα. Για το διαχωρισμό των ισομερών νιτριλίων δοκιμάσθηκαν διάφορα συστήματα έκλουσης, ενώ έγιναν και προσπάθειες εκλεκτικής κρυστάλλωσης. Όμως, οι ενώσεις έχουν ίδια πολικότητα και δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός τους είτε χρωματογραφικά, είτε μέσω κρυστάλλωσης. Επομένως, μελετήθηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης (συγκέντρωση, αναλογία βάσης και κυανομεθανοφωσφονικού διαιθυλεστέρα, θερμοκρασία, προστατευτική ομάδα για την 3*β*-υδροξυλομάδα, χρήση υδριδίου του νατρίου ως βάσης³³⁸) για να ληφθεί το προϊόν **10α** εκλεκτικά (Πίνακας **3.3**). Πίνακας 3.3: Μελέτη της επίδρασης διαφόρων πειραματικών παραμέτρων στην απόδοση και τη στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης Horner-Emmons.

Πείραμα	Αντιδρόν	Ισοδύναμα (βάσης Θερμοκρασία και φωσφ. εστέρα)		α ^α (%)	Ε/Ζ (10α/10β) ^β
1	DHEA	6eq <i>t</i> -BuOK και 4eq φωσφ. εστέρα	θ.π.	63	5:1
2	DHEA	3eq <i>t</i> -BuOK και 2eq φωσφ. εστέρα	θ.π.	89	3:4
3	Ac-DHEA	2.2eq <i>t</i> -BuOK και 2eq φωσφ. εστέρα	θ.π.	82	3:4
4	Ac-DHEA	6eq <i>t</i> -BuOK και 4eq φωσφ. εστέρα	θ.π.	69	3:2
5	DHEA	6eq <i>t</i> -BuOK και 7eq φωσφ. εστέρα	θ.π.	86	2:1
6	DHEA	3eq <i>t</i> -BuOK και 2eq φωσφ. εστέρα	βρασμός	γ	7:2 ^γ
7	DHEA	6eq <i>t</i> -BuOK και 4eq φωσφ. εστέρα	βρασμός	γ	4:1 ^γ
8	DHEA	3.25eq NaH και 1.73eq φωσφ. εστέρα	βρασμός	100	1:0
9	TBS-DHEA	4.5eq NaH και 2.4eq φωσφ. εστέρα	βρασμός	74	1:0

^αΟι αποδόσεις υπολογίζονται μετά από καθαρισμό των προϊόντων με χρωματογραφία στήλης, ^βη αναλογία των δύο ισομερών προκύπτει από ολοκλήρωση των κορυφών τους στο φάσμα πρωτονίου του καθαρού μείγματος, ^γη αναλογία των δύο ισομερών προκύπτει από ολοκλήρωση των κορυφών τους στο φάσμα πρωτονίου του μείγματος μετά την κατεργασία.

Η μετατροπή του νιτριλίου **10α** στην αλδεΰδη **11** πραγματοποιήθηκε με αναγωγή με διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο σε διχλωρομεθάνιο^{339,340}, ενώ περαιτέρω αναγωγή της ένωσης **11** με νατριοβοροϋδρίδιο σε μεθανόλη παρουσία ένυδρου χλωριούχου δημήτριου έδωσε την αλλυλική αλκοόλη **12**, σύμφωνα με τη μέθοδο Luche^{341,342}. Τέλος, η ένωση **13** λαμβάνεται μετά από εποξείδωση της αλκοόλης **12** με 4-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ παρουσία ανθρακικού καλίου ως βάσης σε διχλωρομεθάνιο³⁴³ σε απόδοση 40%.

Για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της εποξείδωση της αλκοόλης **12** χρησιμοποιήθηκε επίσης υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία βολφραμικού νατρίου σε πυριδίνη³⁴⁴, ενώ επιχειρήθηκε και η εποξείδωση του νιτριλίου **10α** και της αλδεΰδης **11** με τον ίδιο τρόπο. Ωστόσο, καμία από τις δοκιμές αυτές δεν είχε ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Σε μια προσπάθεια να μειώσουμε τον αριθμό των πειραματικών σταδίων για τη σύνθεση των αναλόγων 9 και 13, ξεκινήσαμε από μια κοινή πορεία η οποία περιλάμβανε Sharpless αλλυλική εποξείδωση της αλκοόλης 12 (t-BuOOH, Ti(O'Pr)₄), χρησιμοποιώντας κάθε φορά τον κατάλληλο αντίποδα διαιθυλοτρυγικού οξέος. Ωστόσο, δεν καταφέραμε να λάβουμε εκλεκτικά τα επιθυμητά εποξείδια. Επίσης, εποξείδωση της αλκοόλης 12 με t-βουτυλοϋδροϋπεροξείδιο παρουσία συμπλόκου ακετυλοακετόνης βαναδυλίου σε διχλωρομεθάνιο έδωσε μείγμα των εποξειδίων 9 (20S) και 13 (20R) σε αναλογία 1:2, αντίστοιχα. Για το διαχωρισμό του μείγματος χρησιμοποιήθηκε μια ποικιλία συστημάτων έκλουσης, στα οποία οι δύο ενώσεις δεν ήταν διαχωρίσιμες. Όταν το μείγμα των ενώσεων αντέδρασε με πιβαλοϋλοχλωριδίο σε άνυδρη πυριδίνη, προέκυψε μείγμα των αντίστοιχων πιβαλικών εστέρων Ι και ΙΙ. Μετά από το χρωματογραφικό καθαρισμό του μείγματος και εκλεκτική κρυστάλλωση από ακετόνη ελήφθη ο εστέρας ΙΙ. Μετά από διάφορα πειράματα τα οποία έγιναν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και με διαφορετικά αντιδραστήρια³⁴⁵, οι ενώσεις Ι και ΙΙ αποπροστατεύθηκαν με διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο σε διχλωρομεθάνιο στους -95°C³⁴⁶ και ελήφθησαν τα εποξείδια 9 και 13 (Σχήμα 3.7). Αυτή η πορεία είναι ένας άλλος τρόπος σχηματισμού των εποξειδίων 9 και 13, ο οποίος όμως οδηγεί σε χαμηλότερες αποδόσεις από αυτές τις οποίες λάβαμε μέσω των συνθετικών οδών που προαναφέρθηκαν (Σχήμα 3.3 και Σχήμα 3.5, αντίστοιχα).





Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) t-Βουτυλοϋδροϋπεροξείδιο, σύμπλοκο ακετυλοακετόνης βαναδυλίου,
 διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (ii) Τριμεθυλοακετυλοχλωρίδιο, πυριδίνη, θ.π.
- (iii) Εκλεκτική κρυστάλλωση από ακετόνη
- (iv) Διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο, διχλωρομεθάνιο, -95 °C

Στην Εικόνα **3.3** παρατίθενται συγκριτικά τα φάσματα πρωτονίου για τις διαστερεοϊσομερείς ενώσεις **9** και **13**. Όπως φαίνεται, οι κύριες διαφορές των δύο ενώσεων εντοπίζονται στην απορρόφηση της 18-μεθυλομάδας (0.89 ppm στο σπειρο-εποξείδιο **9** και 0.82 ppm στο σπειρο-εποξείδιο **13**), καθώς και των πρωτονίων 20-Η (3.21 ppm στο σπειρο-εποξείδιο **9** και 3.05 ppm στο σπειροεποξείδιο **13**) και ενός από τα πρωτόνια 21-Η (3.77 ppm στο σπειρο-εποξείδιο **9** και 3.82 ppm στο σπειρο-εποξείδιο **13**).



Εικόνα 3.3: ¹Η NMR των ενώσεων 9 και 13.

Σχήμα 3.8: Σύνθεση της ένωσης **28**.



Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) t-Bουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο, ιμιδαζόλιο, ιώδιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (ii) Υδρίδιο του νατρίου, κυανομεθανοφωσφονικός διαιθυλεστέρας, τετραϋδροφουράνιο, βρασμός
- (iii) Διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο, διχλωρομεθάνιο, θ.π.
- (iv) Λιθιοαργιλιοϋδρίδιο, τετραϋδροφουράνιο, 0 °C
- (ν) Διαιθυλοψευδάργυρος, διϊωδομεθάνιο, τολουόλιο, θ.π.
- (vi) Φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.

Η πορεία η οποία ακολουθήθηκε για το κυκλοπροπανικό ανάλογο **28** περιγράφεται στο Σχήμα **3.8**. Προστασία της 3*θ*-υδροξυλομάδας της δεϋδροεπιανδροστερόνης με *t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο παρουσία βάσης και ιωδίου σε τετραϋδροφουράνιο^{347,348} οδήγησε στο ανάλογο **19**, το οποίο με αντίδραση Horner-Emmons³⁴⁹ έδωσε το (*E*)-νιτρίλιο **24**. Αναγωγή του νιτριλίου **24** με διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδρίδιο σε διχλωρομεθάνιο οδήγησε στην *α*,*θ*-ακόρεστη αλδεΰδη **25**³⁵⁰, η οποία ανάχθηκε με λιθιοαργιλιοϋδρίδιο σε τετραϋδροφουράνιο προς την (*E*)-αλλυλική αλκοόλη **26**³⁵⁰. Αντίδραση της αλκοόλης αυτής με το αντιδραστήριο Simmons-Smith (διαιθυλοψευδάργυρο και διϊωδομεθάνιο) σε διαλύτη τολουόλιο^{351,352} έδωσε την ένωση **27**.

Η κυκλοπροπανίωση επίσης δοκιμάσθηκε με επίδραση ιωδιούχου τριμεθυλοσουλφοξόνιου παρουσία διαφόρων βάσεων (υδρίδιο του νατρίου και του καλίου, *t*-βουτοξυκάλιο), σε διάφορους διαλύτες (διμεθυλοφορμαμίδιο,

125

διμεθυλοσουλφοξείδιο, τετραϋδροφουράνιο) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (0°C, θερμοκρασία περιβάλλοντος) στο ακόρεστο νιτρίλιο **10α** και στην ακόρεστη αλδεϋδη **11**, χωρίς όμως να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν³⁵³⁻³⁵⁵. Η αντίδραση Simmons-Smith^{356,357} είναι μια μέθοδος κυκλοπροπανίωσης η οποία υπόκειται σε στερεοχημικούς περιορισμούς, με συνέπεια η προσθήκη του καρβενίου να λαμβάνει χώρα στην λιγότερο παρεμποδισμένη επιφάνεια του διπλού δεσμού και η αντίδραση να είναι στερεοεκλεκτική. Επίσης, στη συγκεκριμένη περίπτωση, σημαντικός είναι και ο ρόλος της 21-υδροξυλομάδας η οποία αλληλεπιδρά με τον ψευδάργυρο, κατευθύνοντας την κυκλοπροπανίωση *cis* ως προς αυτήν³⁵⁸. Ο μηχανισμός της αντίδρασης απεικονίζεται στο Σχήμα **3.9**.



Σχήμα 3.9: Μηχανισμός κυκλοπροπανίωσης Simmons-Smith.

Τελος, απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας από την 3*8*-θέση με επίδραση φθοριούχου τετραβουτυλοαμμωνίου σε τετραϋδροφουράνιο έδωσε την επιθυμητή ένωση **28³⁵⁹**. Ο μηχανισμός της αποπροστασίας είναι παρόμοιος με αυτόν ο οποίος περιγράφεται στο Σχήμα **2.5**.

Για την ένωση **28** ελήφθησαν τα αντίστοιχα φάσματα ¹Η και ¹³C NMR, όπως και τα φάσματα 2D-COSY, HSQC και HMBC τα οποία παρατίθενται στην Εικόνα **3.4** και τα οποία συγκρίθηκαν με βιβλιογραφικά δεδομένα³⁵¹ για την επιβεβαίωση της δομής της.

126

Εικόνα 3.4: ¹Η NMR της ένωσης **28**.



¹³C NMR



Περιοχή ομοπυρηνικού πειράματος GDQ-COSY (Correlation Spectroscopy): σε ένα 2D-COSY οι κορυφές εκτός της διαγωνίου αναπαριστούν συζεύξεις μεταξύ πρωτονίων τα οποία συνδέονται μέσω χημικών δεσμών.



Στο συγκεκριμένο φάσμα, παρατηρείται σύζευξη ανάμεσα στα δύο πρωτόνια της 21-θέσης (3.33 και 3.69 ppm), καθώς επίσης και καθενός από αυτά με το γειτονικό τους 20-Η (1.18 ppm). Τέλος, και τα πρωτόνια 22-Η (0.14 και 0.55 ppm) του κυκλοπροπανικού δακτυλίου συσχετίζονται με το γειτονικό τους πρωτόνιο 20-Η (1.18 ppm). Ετεροπυρηνικό πείραμα G-HSQC-ad (Heteronuclear Single Quantum Spectroscopy): στο πείραμα HSQC αναπαρίστανται οι συσχετισμοί μεταξύ πρωτονίων και ατόμων άνθρακα με τα οποία συνδέονται, δηλαδή παρατηρούνται ετεροπυρηνικές συζεύξεις ¹J_{C-H}.



Από το συγκεκριμένο φάσμα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

α) ο 22-C συντονίζεται στα 11.0 ppm και συσχετίζεται με τα 22-H (0.14 και 0.55 ppm),

β) ο 20-C συντονίζεται στα 55.2 ppm και συσχετίζεται με το 20-Η (1.18 ppm),

γ) ο 21-C συντονίζεται στα 64.1 ppm και συσχετίζεται με τα 21-H (3.33 και 3.69 ppm),

δ) ο 3-C συντονίζεται στα 71.7 ppm και συσχετίζεται με το 3α-Η (3.52 ppm),

ε) ο 6-C συντονίζεται στα 121.6 ppm και συσχετίζεται με το 6-Η (5.36 ppm). Τέλος, δεδομένου ότι ο βινυλικός άνθρακας 5-C είναι τεταρτοταγής και δε συσχετίζεται με κάποιο πρωτόνιο, συμπεραίνουμε ότι συντονίζεται στα 140.7 ppm. Περιοχή ετεροπυρηνικού πειράματος G-HMBC-ad (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence): στο πείραμα HMBC αναπαρίστανται οι συσχετισμοί μεταξύ πρωτονίων και περιβάλλοντων ατόμων άνθρακα. Δηλαδή, συγκριτικά με το φάσμα HSQC ο χρόνος συσχετισμού βελτιστοποιείται ώστε να παρατηρούνται ετεροπυρηνικές συζεύξεις ³J_{C-H}, ⁴J_{C-H} και ⁵J_{C-H}.



Με το συγκεκριμένο φάσμα επιβεβαιώνεται η δομή της ένωσης **28**, αφού παρατηρούνται οι αναμενόμενες συσχετίσεις αφενός μεταξύ καθενός από τα 22-Η (0.14 και 0.55 ppm) του κυκλοπροπανικού δακτυλίου με τον 21-C (64.1 ppm) και αφετέρου ενός από τα 21-Η (3.33 ppm) με τον 22-C (11.0 ppm). Επιπλέον, και τα δύο 21-Η (3.33 και 3.69 ppm) αλληλεπιδρούν με κάποιον άνθρακα του στερεοειδικού σκελετού (21.9 ppm), ενώ ένα από τα 21-Η (3.69 ppm) συσχετίζεται και με δεύτερο ανθρακοάτομο (35.9 ppm). Τέλος, τα πρωτόνια 22-Η (0.14 και 0.55 ppm) αλληλεπιδρούν με άνθρακες του στεροειδικού σκελετού (21.9, 27.0, 35.9 και 41.2 ppm).

Н δεύτερη σειρά των C17-σπειροκυκλικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες περιέχουν υποκατεστημένους ή μη πενταμελείς και εξαμελείς αιθερικούς δακτυλίους, ούτως ώστε να μελετηθεί το βέλτιστο μέγεθος και η υποκατάσταση του σπειρανικού υποκαταστάτη στη θέση C17 (Πίνακας 3.4). Η σύνθεση των νέων αναλόγων βασίσθηκε σε μια κοινή μεθοδολογία, τη λεγόμενη μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου³⁶⁰⁻³⁶⁴ (ring closing metathesis, RCM).

Οι ενώσεις **18** και **23** είναι διϋδροπυρανικά ή διϋδροφουρανικά παράγωγα που προέρχονται από την κλασική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου κατάλληλων υποστρωμάτων³⁶⁵⁻³⁶⁸. Στα αιθερικά αυτά προϊόντα, ο νέος ενδοκυκλικός διπλός δεσμός, ο οποίος σχηματίζεται από τους δύο προϋπάρχοντες με ταυτόχρονη αποβολή αιθυλενίου έχει (*Z*) ή *cis* στερεοχημεία. Στην περίπτωση των ενώσεων **32** και **35**, χρησιμοποιείται η λεγόμενη ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου (ring closing enyne metathesis, RCEM)³⁶⁹, η οποία ξεκινώντας από ένα κατάλληλο υπόστρωμα με διπλό και τριπλό δεσμό οδηγεί στο σχηματισμό ενός **1**,3-*cis*-διενίου.

Πίνακας 3.4: Ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης με σπειροκυκλικούς ακόρεστους αιθερικούς δακτυλίους στη θέση C17.



Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθούμε τόσο στην ίδια την αντίδραση της κύκλωσης, όσο και στο μηχανισμό της. Καταρχάς, η μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου ανήκει σε μια ευρύτερη κατηγορία μεταθέσεων η οποία αφορά στα αλκένια (ή ολεφίνες) και επομένως, είναι γνωστή ως ολεφινική μετάθεση. Στην ολεφινική μετάθεση πραγματοποιείται αναδιοργάνωση των *sp*² ανθρακοατόμων τα οποία συμμετέχουν στους διπλούς δεσμούς, ώστε να προκύψουν τελικά δύο νέα αλκένια. Η ολεφινική μετάθεση είναι μια αντίδραση εξαιρετικής χρησιμότητας με μεγάλο εύρος εφαρμογής, δεδομένου ότι προάγει μοναδικές δομικές ανακατατάξεις οι οποίες δε θα ήταν εφικτές με άλλο τρόπο.

Η σημασία της έγκειται στα πλεονεκτήματα τα οποία παρουσιάζει ως μέθοδος, μερικά από τα οποία είναι:

- 1) Η σχετική ευκολία της σύνθεσης κάθε δυνατού αλκενίου. Η κατάργηση των περιορισμών επιτρέπει τη σύνθεση ακραίων, μονο-, δι-, τρι- ή και τετρα-υποκατεστημένων αλκενίων, ανεξαρτήτως στερεοχημικών ή άλλων παραγόντων, λαμβάνοντας υπόψη ότι συνήθως η μετάβαση γίνεται από απλούστερες δομές προς τις περισσότερο πολύπλοκες. Επίσης, η ύπαρξη κανόνων στη μετάθεση παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της στερεοχημείας (cis ή trans, E ή Z) των προϊόντων, οπότε η αποτελεσματική και στερεοεκλεκτική σύνθεση νέων υποστρωμάτων προσδίδει ακόμη μεγαλύτερη αξία σε αυτή τη νέα συνθετική μέθοδο.
- **2)** Το μοναδικό "παραπροϊόν" της αντίδρασης μπορεί να είναι το αιθυλένιο³⁷⁰.
- 3) Τα παραγόμενα αλκένια αποτελούν κατάλληλες ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για να οδηγηθούμε σε μια πληθώρα άλλων δομών. Η σταθερότητά τους, η οποία καθιστά δυνατή την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα, καθώς και η επαρκής δραστικότητα του π-δεσμού, ο οποίος συμμετέχει σε μια ποικιλία μετασχηματισμών, δημιουργούν έναν ιδανικό συνδυασμό ιδιοτήτων για τα αλκένια ως ενδιάμεσα στη σύνθεση ενώσεων άλλων κατηγοριών.

Η ολεφινική μετάθεση μπορεί να διακριθεί σε τρεις υποκατηγορίες: διασταυρούμενη μετάθεση (cross metathesis), μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου (ring closing metathesis) και μετάθεση με διάσπαση δακτυλίου (ring opening

132

metathesis)³⁷¹ (Σχήμα **3.10**). Καθεμιά από αυτές αντιπροσωπεύει μια διαφορετικού τύπου αντίδραση και συνεπώς, οδηγεί και σε διαφορετικού τύπου προϊόντα.



Σχήμα 3.10: Διαφορετικοί τύποι ολεφινικής μετάθεσης οι οποίοι εφαρμόζονται στην οργανική σύνθεση.

Στη διασταυρούμενη μετάθεση με τη χρήση καταλύτη δύο αλκένια αναδιοργανώνονται προς ένα νέο ζεύγος αλκενίων, το οποίο είναι και το ενεργειακά ευνοούμενο. Δεδομένου ότι πρόκειται για αντιστρεπτή αντίδραση, απαιτείται σωστός σχεδιασμός προκειμένου να αποφευχθεί η αντίστροφη αντίδραση και συνεπώς, η παραλαβή των αρχικών αλκενίων. Ο δεύτερος τύπος αντιδράσεων είναι η μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου³⁷¹, στην οποία δύο ακραία αλκένια αντιδρούν παρουσία καταλύτη για να σχηματίσουν ένα νέο κυκλικό αλκένιο. Συγχρόνως, απελευθερώνεται και μια μικρότερη ολεφίνη η οποία συνήθως είναι πτητική και μετάθεση με διάσπαση δακτυλίου³⁷¹ συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή η αντίδραση μιας κυκλικής και μιας γραμμικής ολεφίνης οδηγεί σε ένα νέο μη κυκλικό διένιο. Η κινητήρια δύναμη σε αυτήν την περίπτωση είναι η απελευθέρωση της τάσης η οποία υπάρχει στις κυκλικές δομές³⁷². Μηχανιστικά, οι αντιδράσεις διασταυρούμενης μετάθεσης είναι πολυπλοκότερες, αφού υπάρχει η πιθανότητα του (ομο)διμερισμού και για αυτό το λόγο, είναι δυσκολότερος ο έλεγχος αυτών των μετασχηματισμών. Εν αντιθέσει, ανάλογα προβλήματα δεν ανακύπτουν στη μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου, αφού συχνά μια ενδομοριακή διαδικασία προτιμάται έναντι μιας αντίστοιχης διαμοριακής, εκτός και αν επιδιώκεται η σύνθεση μιας τεταμένης και εντροπικά δυσμενούς δομής³⁷³.

Στην ολεφινική μετάθεση, χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον καταλύτες όπου το κεντρικό άτομο είναι μολυβδένιο³⁷⁴ (Mo) ή ρουθήνιο³⁷¹ (Ru) (Σχήμα **3.11**). Οι καταλύτες αυτών των μετάλλων παρουσιάζουν εξαιρετική σταθερότητα και δραστικότητα στις συγκεκριμένου τύπου αντιδράσεις και πολλοί από αυτούς είναι ήδη εμπορικά διαθέσιμοι. Τα μεταλλικά κέντρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις ιδιότητες των καταλυτών, διότι είναι γνωστό ότι στα αλκυλιδένια μολυβδενίου (Mo=C) και στα καρβένια του ρουθηνίου (Ru=C) οι διπλοί δεσμοί είναι τα σημεία επαφής μεταξύ των καταλυτών και των αντιδρώντων αλκενίων. Η δράση των καταλυτών αυτών των δύο μετάλλων είναι συμπληρωματική³⁷⁴, αφού οι καταλύτες μολυβδενίου χρησιμοποιούνται σε αδρανή ατμόσφαιρα, ενώ οι αντίστοιχοι καταλύτες ρουθηνίου είναι περισσότερο σταθεροί στον αέρα και την υγρασία. Επιπλέον, οι καταλύτες ρουθηνίου χρησιμοποιούνται όταν τα υποστρώματα φέρουν αλκοόλες, καρβοξυλικά οξέα ή αλδεΰδες ως λειτουργικές ομάδες, ενώ οι καταλύτες μολυβδενίου είναι ιδανικότεροι σε συνδυασμό με υποστρώματα τα οποία φέρουν πρωτοταγείς αμίνες και φωσφίνες^{375,376}.

134



Σχήμα 3.11: Αντιπροσωπευτικότερες δομές καταλυτών ολεφινικής μετάθεσης: η δομή Ι είναι γνωστή ως καταλύτης του Schrock, ενώ οι δομές ΙΙ και ΙΙΙ απεικονίζουν τους καταλύτες Grubbs πρώτης και δεύτερης γενιάς, αντίστοιχα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ο σχηματισμός των ενδιαμέσων **17** και **22** επιτυγχάνεται με τη μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου και με χρήση του καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς. Η μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα επιτεύγματα στην "τέχνη και την επιστήμη" της οργανικής σύνθεσης^{362,363}, ενώ ανάμεσα σε άλλους ερευνητές ο Grubbs και η ομάδα του θεωρούνται πρωτοπόροι στην ανάπτυξη νέων καταλυτών με βελτιωμένες ιδιότητες^{360,361,377} (δραστικότητα, σταθερότητα, εκλεκτικότητα). Ειδικότερα, για τη συμβολή του στη σύνθεση καταλυτών οι οποίοι βρίσκουν εφαρμογή στην ολεφινική μετάθεση ο R.H. Grubbs τιμήθηκε το 2005 με το Nobel Χημείας, το οποίο και μοιράσθηκε με τους Y. Chauvin και R.R. Schrock. Ο καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς είναι ένα σύμπλοκο με βάση το ρουθήνιο και έχει τη δομή η οποία φαίνεται στο Σχήμα **3.11** (δομή **III**), ενώ στο Σχήμα **3.12** παρατίθεται ο καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης³⁷⁸.

Γενικότερα, σε αυτούς τους καταλύτες το αλκένιο είναι αυτό το οποίο δρα ως οξύ κατά Lewis κατά την αλληλεπίδρασή του με το μέταλλο³⁷⁹⁻³⁸³. Ο καταλυτικός κύκλος περιλαμβάνει δύο φάσεις: αυτήν της εκκίνησης (**A**) όπου παράγεται το ενεργό ενδιάμεσο και αυτήν της διάδοσης (**B**) όπου το ενεργό ενδιάμεσο συμμετέχει σε επιπλέον κύκλους. Αρχικά, το ενεργό καρβένιο (Ru=C) συμπλέκεται με ένα από τα δύο αλκένια Ι και παράγεται το μεταλλοκυκλοβουτάνιο **II**^{384,385}. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να εμπλακεί είτε στο μονοπάτι *α*, το οποίο οδηγεί στο αντιδρόν ή στο μονοπάτι *β*, το οποίο προωθεί το σχηματισμό του ενδιάμεσου **ΙΙΙ**, όπου το μέταλλο έχει ενσωματωθεί στο υπόστρωμα. Ο σχηματισμός του επόμενου μεταλλοκυκλοβουτανίου **IV** και η διάσπασή του προς το κυκλικό προϊόν **V** και το νέο μεταλλοκαρβένιο **VI** το οποίο δρα ως καταλύτης στον επόμενο κύκλο, χωρίς να προκαλεί μετάθεση με άνοιγμα δακτυλίου του κυκλικού προϊόντος, ολοκληρώνουν τον καταλυτικό κύκλο. Τα ενδιάμεσα του μηχανισμού είναι ταυτοποιημένα³⁸⁶, αλλά δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί ποιο είναι το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης.



Σχήμα 3.12: Μηχανισμός μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου.



Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) t-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοχλωρίδιο, ιμιδαζόλιο, ιώδιο, τετραϋδροφουράνιο, ϑ.π.
- (ii) Αλλυλομαγνησιοχλωρίδιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (iii) Αλλυλοβρωμίδιο, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο, βρασμός
- (iv) Καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς, βενζόλιο, βρασμός
- (ν) Φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (vi) t-Bουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο, ιμιδαζόλιο, ιώδιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.
- (vii) Βινυλομαγνησιοβρωμίδιο, τετραϋδροφουράνιο, ϑ.π.

Η σύνθεση των ενώσεων **18** και **23** φαίνεται στο Σχήμα **3.11**. Προστασία της δεϋδροεπιανδροστερόνης στην 3*6*-θέση με *t*-βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοχλωρίδιο παρουσία ιμιδαζολίου και ιωδίου σε τετραϋδροφουράνιο³⁴⁷, ακολουθούμενη από προσθήκη αλλυλομαγνησιοχλωριδίου στο 17-καρβονύλιο της ένωσης **14** σε τετραϋδροφουράνιο οδήγησε αποκλειστικά στη 17*6*-αλκοόλη **15**³⁸⁷⁻³⁸⁹. Αλκυλίωση της αλκοόλης **15** με αλλυλοβρωμίδιο με χρήση υδριδίου του νατρίου ως βάσης σε τετραϋδροφουράνιο οδήγησε στο ανάλογο **16**.

Οι συνθήκες αντίδρασης της αλκυλίωσης βελτιστοποιήθηκαν μεταβάλλοντας το διαλύτη (διμεθυλοφορμαμίδιο, εξαμεθυλοφωσφοραμίδιο, τετραϋδροφουράνιο), τη βάση (διϊσοπροπυλαμίδιο του λιθίου, *t*-βουτοξυκάλιο, υδρίδιο του νατρίου), τα ισοδύναμα βάσης και βρωμιδίου και τη θερμοκρασία^{390,391} (θερμοκρασία περιβάλλοντος, βρασμός) (Πίνακας **3.5**).

Πείραμα	Βάση	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Ισοδύναμα (βάσης και βρωμιδίου)	Σημειώσεις ^α
1	NaH	DMF	θ.π.	2(βάση)	β
2	t-BuOK	DMF	θ.π.	3(βρωμίδιο) 2(βάση) 3(βρωμίδιο)	β
3	NaH	THF	θ.π.	3	<u> </u>
4	NaH	THF	θ.π.	5	<u> </u>
5	LDA	THF	θ.π.	5	β,γ
6	NaH	THF	θ.π.	10	<u>_</u> β
7	NaH	THF	βρασμός	3	<u>_</u> δ
8	NaH	THF	βρασμός	10	94-96

Πίνακας 3.5: Πειραματικές συνθήκες οι οποίες δοκιμάσθηκαν για τη βελτιστοποίηση της αλκυλίωσης των τριτοταγών αλκοολών 15 και 20.

^αΟι δοκιμές γίνονται σε 3α-TBDPS-προστατευμένη βινυλο- ή αλλυλο-αλκοόλη, ^βδε σχηματίζεται προϊόν, ^γχρήση εξαμεθυλοφωσφοραμιδίου, ^δσχηματίζεται προϊόν σε πολύ μικρό ποσοστό.

Τελικά, η βέλτιστη απόδοση ελήφθη με χρήση περίσσειας υδριδίου του νατρίου και αλλυλοβρωμιδίου (10 ισοδύναμα) σε τετραϋδροφουράνιο με θέρμανση υπό επαναρροή^{392,393}. Στη συνέχεια, ο αιθέρας **16** μέσω μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου παρουσία καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς σε βενζόλιο³⁹¹ οδήγησε στο σπειροκυκλικό αιθέρα **17**. Απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας του 3*θ*υδροξυλίου με φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο σε τετραϋδροφουράνιο οδήγησε στην ένωση **18**, η δομή της οποίας ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ¹H, ¹³C NMR και πειράματα δύο διαστάσεων (2D-NMR:COSY, HSQC, HMBC), καθώς και με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα^{366,367} (Εικόνα **3.5**).

Ανάλογη πορεία ακολουθήθηκε για την ένωση 23. Προστασία της 36υδροξυλομάδας της δεϋδροεπιανδροστερόνης προς τον αντίστοιχο tβουτυλοδιμεθυλοσιλυλοαιθέρα 19, ακολουθούμενη από προσθήκη βινυλομαγνησιοβρωμιδίου σε τετραϋδροφουράνιο³³⁶ οδήγησε στην αλκοόλη **20**. Αλκυλίωση της τελευταίας με αλλυλοβρωμίδιο και υδρίδιο του νατρίου σε τετραϋδροφουράνιο έδωσε τον αιθέρα **21³⁶⁷, ο οποίος υπέστη μετάθεση με** κλείσιμο δακτυλίου με τη χρήση καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς σε βενζόλιο³⁹¹ προς το κυκλοποιημένο προϊόν 22, το οποίο αποπροστατεύθηκε, οδηγώντας στην επιθυμητή ένωση 23.

Εικόνα 3.5: ¹Η NMR της ένωσης **18**.



¹³C NMR



Ομοπυρηνικό πείραμα GDQ-COSY



Στο συγκεκριμένο φάσμα, παρατηρείται σύζευξη μεταξύ των βινυλικών πρωτονίων 21-H (5.67 ppm) και 22-H (5.75 ppm) του κυκλοεξενικού αιθερικού δακτυλίου, η οποία λόγω της εγγύτητας των χημικών μετατοπίσεων των εν λόγω πρωτονίων συμπίπτει με τη διαγώνιο του φάσματος. Επίσης, παρατηρείται σύζευξη του βινυλικού πρωτονίου 21-H (5.67 ppm) και των αιθερικών πρωτονίων 23-H (4.18 ppm), καθώς επίσης και σύζευξη του ίδιου βινυλικού πρωτονίου με ένα εκ των πρωτόνιων 20-H (2.36 ppm). Ετεροπυρηνικό πείραμα G-HSQC-ad



Από το συγκεκριμένο φάσμα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

α) ο 20-C συντονίζεται στα 31.2 ppm και συσχετίζεται με το 20-Η (2.36 ppm),

β) ο 3-C συντονίζεται στα 71.6 ppm και συσχετίζεται με το 3α-Η (3.48 ppm),

γ) ο 23-C συντονίζεται στα 63.2 ppm και συσχετίζεται με τα 23-Η (4.18 ppm),

δ) ο 6-C συντονίζεται στα 121.3 ppm και συσχετίζεται με το 6-Η (5.33 ppm),

ε) ο 21-C συντονίζεται στα 125.8 ppm και συσχετίζεται με το 21-Η (5.68 ppm),

στ) ο 22-C συντονίζεται στα 123.3 ppm και συσχετίζεται με το 22-H (5.72 ppm). Τέλος, δεδομένου ότι ο βινυλικός άνθρακας 5-C και ο τεταρτοταγής άνθρακας 17-C δε συσχετίζονται με κάποιο πρωτόνιο, προκύπτει ότι συντονίζονται στα 140.8 και 83.0 ppm, αντίστοιχα.



Περιοχή ετεροπυρηνικού πειράματος G-HMBC-ad

Το συγκεκριμένο φάσμα επιβεβαιώνει τη δομή της ένωσης **18**, αφού παρατηρούνται τα εξής:

α) το ένα από τα δύο αλλυλικά πρωτόνια 20-Η (2.36 ppm) συσχετίζεται με τον 17-C
 (83.0 ppm),

β) καθένα από τα βινυλικά πρωτόνια 21-Η (5.68 ppm) και 22-Η (5.72 ppm) αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς του άνθρακες 20-C (31.2 ppm) και 23-C (63.2 ppm) και

γ) τα αιθερικά πρωτόνια 23-Η (4.18 ppm) αλληλεπιδρούν με τους άνθρακες 17-C (83.0 ppm), 22-C (123.3 ppm) και 21-C (125.8 ppm).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για τη σύνθεση των σπειρανικών αιθέρων **32** και **35** χρησιμοποιήθηκε η λεγόμενη ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου (ring closing enyne metathesis, RCEM)^{369,371,394-397}. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την αναδιοργάνωση ενός αλκενίου και ενός αλκυνίου προς σχηματισμό ενός 1,3-διενίου υπό ήπιες συνθήκες (Σχήμα **3.14**). Στην περίπτωση όπου ο διπλός και το τριπλός δεσμός ανήκουν στο ίδιο μόριο, τότε λαμβάνει χώρα μια ενδομοριακή κύκλωση προς σχηματισμό κυκλικών διενίων (RCEM), όπως οι ενώσεις **32** και **35**.



Σχήμα 3.14: Αντιδράσεις ενυνικής μετάθεσης στην οργανική χημεία.

Η ενυνική μετάθεση είναι μια αντίδραση με τεράστιες συνθετικές εφαρμογές, η οποία χαρακτηρίζεται επίσης και ως "οικονομική" από απόψεως ατόμων³⁹⁸, αφού δεν παράγεται κανένα παραπροϊόν. Διέπεται μάλλον από ενθαλπικούς παρά από εντροπικούς παράγοντες, λόγω της αυξημένης σταθερότητας του συζυγιακού συστήματος των τελικών διενίων, και με κατάλληλη τοποθέτηση του διπλού και τριπλού δεσμού στο αρχικό υπόστρωμα μπορεί να προκύψουν εκλεκτικά ακόμα και πολύπλοκες κυκλικές δομές³⁹⁹⁻⁴⁰¹.

Η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία γίνεται από τον Katz και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ταυτόχρονα προτείνουν και το μέχρι σήμερα αποδεκτό μηχανισμό ο οποίος περιλαμβάνει μια [2+2] κυκλοπροσθήκη ακολουθούμενη από μια κυκλοαναστροφή με τη συμμετοχή και ενός μεταλλοκαρβένιου³⁹⁴. Μεταγενέστερα, η ομάδα του Trost διεύρυνε την γκάμα των μετάλλων μετάπτωσης τα οποία μπορούν να καταλύσουν τέτοιου τύπου αντιδράσεις⁴⁰²⁻⁴⁰⁶, με αποτέλεσμα σήμερα να χρησιμοποιούνται καταλύτες ρουθηνίου, ιριδίου και λευκόχρυσου. Με
άλλα λόγια, οι ίδιοι καταλύτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην ολεφινική μετάθεση βρίσκουν εφαρμογή και στην ενυνική μετάθεση. Ωστόσο, ο Mori και η ομάδα του υπήρξαν πρωτοπόροι στην ανάδειξη των συμπλόκων ρουθηνίου ως των περισσότερο διαδεδομένων καταλυτών της ενυνικής μετάθεσης, κυρίως εξαιτίας της υψηλής δραστικότητας και της ανοχής στην παρουσία διαφόρων λειτουργικών ομάδων³⁹⁵.

Ο τρόπος δράσης των εν λόγω συμπλόκων απεικονίζεται στο Σχήμα **3.15**. Αρχικά, ο τριπλός δεσμός του υποστρώματος Ι αντιδρά με τον καταλύτη για να σχηματισθεί το ενδιάμεσο μεταλλοκυκλοβουτάνιο ΙΙ. Η [2+2] κυκλοπροσθήκη οδηγεί στο σχηματισμό ενός νέου διπλού δεσμού και ενός νέου καρβενίου ΙΙΙ. Ακολουθεί η ολεφινική μετάθεση, καθώς ο διπλός δεσμός αντιδρά με το μεταλλοκαρβένιο προς το ενδιάμεσο ΙV. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζεται το 1,3-διένιο V και να απελευθερώνεται το νέο ενεργό καρβένιο VI, το οποίο συνεχίζει στον επόμενο καταλυτικό κύκλο.



Σχήμα 3.15: Προτεινόμενος μηχανισμός της ενυνικής μετάθεσης με κλείσιμο δακτυλίου στην περίπτωση ακραίου αλκυνίου.

Δεδομένης της φύσης του προϊόντος της ενυνικής μετάθεσης, τίθεται το ζήτημα της *exo/endo*-εκλεκτικότητας. Ειδικότερα, στην ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου η παράμετρος αυτή είναι καθοριστική του μεγέθους του δακτυλίου ο οποίος και σχηματίζεται, διότι στα *endo*-προϊόντα ο δακτύλιος περιέχει ένα επιπλέον άτομο άνθρακα συγκριτικά με τα *exo*-προϊόντα^{407,408}. Σύμφωνα με το Σχήμα **3.16**, τα *exo*-προϊόντα ευνοούνται για δακτυλίους μικρού ή μεσαίου μεγέθους^{394,409}, σε αντίθεση με τα *endo*-προϊόντα τα οποία παράγονται κατεξοχήν στα μακροκυκλικά μόρια⁴¹⁰⁻⁴¹², καθώς και στη διασταυρούμενη ενυνική μετάθεση (cross enyne metathesis)⁴¹³. Τέλος, όσον αφορά στο σχηματισμό μεγάλων δακτυλίων οι οποίοι απαιτούν ατμόσφαιρα αιθυλενίου, δεν μπορεί να προβλεφθεί ποια διάταξη θα επικρατήσει. Αυτό οφείλεται στη σχετικά μικρή ταχύτητα σχηματισμού του δακτυλίου, οπότε η διασταυρούμενη μετάθεση μεταξύ του αιθυλενίου και του αλκυνίου του υποστρώματος κυριαρχεί, μετατρέποντας τη δυσκολότερη ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου στην ευκολότερη διενική



Σχήμα 3.16: Συσχέτιση της exo/endo-εκλεκτικότητας με το μέγεθος του σχηματιζόμενου δακτυλίου στην ενυνική μετάθεση με κλείσιμο δακτυλίου.

Σχήμα 3.17: Σύνθεση των ενώσεων **32** και **35**.



Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- (i) Προπαργυλοβρωμίδιο, υδρίδιο του νατρίου, τετραϋδροφουράνιο, βρασμός
- (ii) Καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς, βενζόλιο, βρασμός
- (iii) Φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο, τετραϋδροφουράνιο, θ.π.

Στο Σχήμα **3.17** απεικονίζεται η σύνθεση των ενώσεων **32** και **35**. Και στις δύο περιπτώσεις, η πειραματική πορεία είναι κοινή και περιλαμβάνει: α) αλκυλίωση των αλκοολών **20** και **29**^{389,414} με προπαργυλοβρωμίδιο παρουσία υδριδίου του νατρίου σε τετραϋδροφουράνιο η οποία έδωσε τους αιθέρες **30** και **33**, αντίστοιχα, β) ενυνική μετάθεση των προαναφερόμενων αιθέρων με τη χρήση καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς σε βενζόλιο για τη σύνθεση των 17σπειροκυκλικών αιθέρων **31** και **34** και γ) αποπροστασία με φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο σε τετραϋδροφουράνιο προς τις τελικές ενώσεις **32** και **35**.

Σχετικά με την αλκυλίωση των τριτοταγών αλκοολών **20** και **29**, πραγματοποιήθηκαν πολλές δοκιμές για τη βελτιστοποίηση της απόδοσής της⁴¹⁴⁻⁴¹⁶. Στον Πίνακα **3.6** παρουσιάζονται συνοπτικά όλες οι συνθήκες οι οποίες δοκιμάσθηκαν για την αλκυλίωση με προπαργυλοβρωμίδιο και στα δύο αλκοολικά υποστρώματα. Η βέλτιστη απόδοση λαμβάνεται όταν χρησιμοποιείται μεγάλη περίσσεια υδριδίου του νατρίου και προπαργυλοβρωμιδίου σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο και σε συνθήκες θέρμανσης υπό επαναρροή. Επίσης,

παρατηρείται ότι λαμβάνονται υψηλότερες αποδόσεις, όσο περισσότερο αυξάνεται η κλίμακα του πειράματος.

Πίνακας 3.6: Πειραματικές συνθήκες οι οποίες δοκιμάσθηκαν για τη βελτιστοποίηση της αλκυλίωσης των τριτοταγών αλκοολών 20 και 29.

Πείραμα	Βάση	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Ισοδύναμα (βάσης και βρωμιδίου)	Απόδοση (%)
1	NaH	THF	θ.π.	3	α
2	NaH	THF	βρασμός	10	β
3	NaH	THF	—	10	γ
4	NaH	THF	βρασμός	10	<u>_</u> δ
5	NaH	DMF	90°C 10		<u>_</u> α
6	NaH	DMF	— 15		γ
7	<i>t</i> -BuOK	DMF	90°C	5	<u>_</u> α
8	NaH	THF	βρασμός 5		17 ^ε
9	NaH	THF	βρασμός 2(βάση)		<u>_</u> α
				3(βρωμίδιο)	
10	<i>n</i> -BuLi	THF	βρασμός 2		στ
11	NaH	THF	βρασμός 5(βάση)		4 ^ζ
				20(βρωμίδιο)	
12	NaH	THF	βρασμός	10	62-88 ^ε

^αΔε σχηματίζεται προϊόν, ^θχρήση εξαμεθυλοφωσφοραμιδίου, ^γχρήση μικροκυμάτων (30 λεπτά-135°C στο πείραμα 3, 30 λεπτά-150°C στο πείραμα 6), ^δχρήση καταλυτικής ποσότητας ιωδιούχου τετραβουτυλαμμώνιου, ^εαπόδοση σε προϊόν μετά από καθαρισμό, ^{στ}χρήση τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης, ^ζαπόδοση σε προϊόν μετά από ολοκλήρωση του ¹Η NMR.

Στην Εικόνα **3.6** παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου του αιθέρα **33**, ο οποίος λαμβάνεται με την επίδραση προπαργυλοβρωμιδίου στην αλκοόλη **20**. Χαρακτηριστική είναι η κορυφή στα 2.34 ppm η οποία ανήκει στο ακραίο πρωτόνιο 24-Η της προπαργυλομάδας, ενώ στα 4.02 ppm συντονίζονται τα αιθερικά πρωτόνια 22-Η. **Εικόνα 3.6:** ¹Η NMR της ένωσης **33**.



Στην Εικόνα **3.7** παρατίθενται χαρακτηριστικά τα φασματοσκοπικά δεδομένα (φάσματα ¹H, ¹³C NMR, καθώς και φάσματα 2D-COSY, HSQC και HMBC) τα οποία ελήφθησαν για την ένωση **32**, η ταυτοποίηση της οποίας έγινε και με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα⁴¹⁷.

Εικόνα 3.7: ¹Η NMR της ένωσης **32**.



¹³C NMR







Στο συγκεκριμένο φάσμα, παρατηρείται σύζευξη μεταξύ των γειτονικών βινυλικών πρωτονίων 24-Η (6.24 ppm) και 25-Η (4.90 ppm). Επίσης, παρατηρείται σύζευξη του βινυλικού πρωτονίου 21-Η (5.78 ppm) με ένα εκ των δύο αλλυλικών πρωτονίων 20-Η (2.46 ppm).



Από το συγκεκριμένο φάσμα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα: α) ο 20-C συντονίζεται στα 31.6 ppm και συσχετίζεται με το 20-H (2.46 ppm), β) ο 3-C συντονίζεται στα 71.7 ppm και συσχετίζεται με το 3α-H (3.49 ppm), γ) ο 23-C συντονίζεται στα 62.7 ppm και συσχετίζεται με τα 23-H (4.37 ppm), δ) ο 25-C συντονίζεται στα 110.3 ppm και συσχετίζεται με τα 25-H (4.88 ppm), ε) ο 6-C συντονίζεται στα 121.3 ppm και συσχετίζεται με το 6-H (5.34 ppm), στ) ο 21-C συντονίζεται στα 125.4 ppm και συσχετίζεται με το 21-H (5.78 ppm), ζ) ο 24-C συντονίζεται στα 135.8 ppm και συσχετίζεται με το 24-H (6.24 ppm).

Τέλος, δεδομένου ότι ο βινυλικός άνθρακας 5-C συντονίζεται στα 140.8 ppm και ο τεταρτοταγής άνθρακας 17-C στα 83.4 ppm, προκύπτει ότι ο 22-C συντονίζεται στα 134.3 ppm.

Περιοχή ετεροπυρηνικού πειράματος G-HMBC-ad



Το συγκεκριμένο φάσμα επιβεβαιώνει τη δομή της ένωσης **32**, αφού παρατηρούνται τα εξής:

α) το ένα από τα δύο αλλυλικά πρωτόνια 20-Η (2.46 ppm) συσχετίζεται με τον 17-C
 (83.4 ppm) και με τον 22-C (134.3 ppm),

β) τα αιθερικά πρωτόνια 23-Η (4.37 ppm) αλληλεπιδρούν με τους άνθρακες 17-C (83.4 ppm), 21-C (125.4 ppm) και 22-C (134.3 ppm),

γ) τα βινυλικά πρωτόνια 25-Η (4.88 ppm) συσχετίζονται με τον άνθρακα 22-C (134.3 ppm) και

δ) το βινυλικό πρωτόνιο 24-Η αλληλεπιδρά με τους άνθρακες 23-C (62.7 ppm), 21-C (125.4 ppm) και 22-C (134.3 ppm).

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</u>

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 7(*Z*)-(*O*-ΚΑΡΒΟΞΥΜΕΘΥΛ)ΟΞΙΜΗΣ ΤΗΣ 3*B*-ΥΔΡΟΞΥ-ΑΝΔΡΟΣΤ-5-ΕΝ-7,17-ΔΙΟΝΗΣ-ΠΡΟΣΔΕΔΕΜΕΝΗΣ

ΣE NovaPEG AMINO-PHTINH

Η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) είναι μία από τις πιο συχνά απαντώμενες στεροειδείς ορμόνες στο ανθρώπινο σώμα και γενικότερα, αναφέρεται ως το πρώτο νευροστεροειδές το οποίο παρήχθη στον εγκέφαλο. Είναι ευρέως γνωστή η συμμετοχή της σε πολλαπλές εγκεφαλικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της νευρογένεσης και της επιβίωσης των νευρώνων, τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά τη γήρανση. Παρόλα αυτά, έως σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποιος ειδικός κυτταρικός υποδοχέας για αυτό το τόσο σημαντικό στεροειδές.

Προκαταρκτικά πειράματα υποδηλώνουν την πρόσδεση της δεϋδροεπιανδροστερόνης σε μεμβρανικούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς του νευροαυξητικού παράγοντα³¹⁵. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αυτή την υπόθεση, προχωρήσαμε στη σύνθεση της 7(Ζ)-(Ο-καρβοξυμεθυλ)οξίμης της 36υδροξυ-ανδροστ-5-εν-7,17-διόνης (DHEA-7-CMO) και στην ομοιοπολική πρόσδεσή της στην αμινο-ρητίνη πολυαιθυλενογλυκόλης (NovaPEG αμινο-ρητίνη) (Σχήμα 4.1), στεροειδές ενώ το ακινητοποιημένο χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης²⁵¹.

Η NovaPEG αμινο-ρητίνη επιλέχθηκε λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων της. Το πολυμερές αποτελείται εξ ολοκλήρου από πολυαιθυλενογλυκόλη και άρα, η συγκεκριμένη ρητίνη διογκώνεται εύκολα και ταχέως σε μια ποικιλία διαλυτών (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο, διμεθυλοφορμαμίδιο, τετραϋδροφουράνιο, τολουόλιο), συμπεριλαμβανομένου και του νερού. Συνεπώς, η υψηλή υδροφιλικότητά της την καθιστά κατάλληλη για τη χρήση της στις μελέτες ανοσοκατακρήμνισης των υποδοχέων του νευροαυξητικού παράγοντα από το ακινητοποιημένο παράγωγο της δεϋδροεπιανδροστερόνης.

Σχήμα 4.1: Σύνθεση της ένωσης **41** και πρόσδεσή της στη NovaPEG αμινο-ρητίνη.



Αντιδραστήρια και συνθήκες:

- *(i) Οξικός ανυδρίτης, πυριδίνη, θ.π.*
- (ii) Αιθυλενογλυκόλη, 4-τολουολοσουλφονικό οξύ, διαιθοξυμεθοξυαιθάνιο, 90 °C
- (iii) Διένυδρο διχρωμικό νάτριο, Ν-υδροξυ-φθαλιμίδιο, ακετόνη-πυριδίνη, θ.π.
- (iv) Υδροχλωρικό αλάτι της Ο-(καρβοξυμεθυλο)υδροξυλαμίνης, πυριδίνη, θ.π.
- (ν) Ένυδρο 4-τολουολοσουλφονικό οξύ, ακετόνη-νερό, ϑ.π.
- (vi) Υδροξείδιο του λιθίου, μεθανόλη, θ.π.
- (vii) Ένυδρο 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο, Ν,Ν'-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο, NovaPEG αμινορητίνη, διμεθυλοφορμαμίδιο, θ.π.

Το οξιμικό παράγωγο **41** είναι μια γνωστή ένωση στη βιβλιογραφία^{418,419} και στην παρούσα διατριβή επετεύχθη η βελτιστοποιημένη σύνθεση της σε έξι στάδια με συνολική απόδοση της τάξης του 63%, με τελικό στόχο την πρόσδεση του στεροειδούς στη NovaPEG αμινο-ρητίνη.

Αναλυτικότερα, η υδροξυλομάδα στην 3*8*-θέση προστατεύθηκε με τη μορφή του αντίστοιχου οξικού εστέρα **36** με τη χρήση οξικού ανυδρίτη σε πυριδίνη^{420,421}, ενώ το καρβονύλιο στη 17-θέση προστατεύθηκε ως κετάλη με τη χρήση αιθυλενογλυκόλης σε διαιθοξυμεθοξυαιθάνιο παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4τολουολοσουφονικού οξέος προς την ένωση **37**^{422,423}. Η αλλυλική οξείδωση στην C7-θέση με οξείδιο του χρωμίου και 3,5-διμεθυλοπυραζόλιο σε διχλωρομεθάνιο είναι μια αντίδραση η οποία γενικότερα παρουσιάζει προβλήματα τόσο στην κατεργασία, όσο και στην απόδοση (50%). Σε μια προσπάθεια μείωσης του αριθμού των συνθετικών σταδίων, η συγκεκριμένη αντίδραση επιχειρήθηκε στην ελεύθερη δεϋδροεπιανδροστερόνη με επίδραση *t*-βουτυλοϋδροϋπεροξειδίου και καταλυτικής ποσότητας χλωριούχου βισμούθιου σε ακετονιτρίλιο⁴²⁴, χωρίς όμως ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Τελικά, η ένωση **37** οξειδώθηκε με περίσσεια διένυδρου διχρωμικού νατρίου παρουσία *N*-υδροξυ-φθαλιμιδίου σε μείγμα ακετόνης και πυριδίνης και ελήφθη το προϊόν **38**^{422,425} σε απόδοση 78%.

Στη συνέχεια, αντίδραση της ακόρεστης κετόνης **38** με το υδροχλωρικό αλάτι της *O*-(καρβοξυμεθυλο)υδροξυλαμίνης σε πυριδίνη οδήγησε ποσοτικά στο (*Z*)ισομερές της αντίστοιχης πλήρως προστατευμένης ένωσης **39**⁴²⁶. Αρχικά, απομακρύνθηκε η προστατευτική ομάδα στη 17-θέση με την επίδραση ένυδρου 4τολουολοσουλφονικού οξέος σε μείγμα ακετόνης-νερού⁴²⁶ και σε δεύτερη φάση, η ένωση **40** αντέδρασε με υδροξείδιο του λιθίου σε μεθανόλη, για να σχηματισθεί η επιθυμητή ένωση **41** σε καθαρή μορφή⁴²³. Η δομή της ένωσης επιβεβαιώθηκε μετά από σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων της με αυτά της βιβλιογραφίας^{418,419} (Εικόνα **4.1**). **Εικόνα 4.1:** ¹Η NMR της ένωσης **41**.



¹³C NMR



Τέλος, η πρόσδεση της (*Z*)-οξίμης της δεϋδροεπιανδροστερόνης στη NovaPEG αμινο-ρητίνη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για τη σύζευξη αμινοξέων στη σύνθεση πεπτιδικών αλυσίδων^{427,428}. Ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας με *N*,*N*'-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο παρουσία ένυδρου 1-υδροξυβενζοτριαζόλιου (για την αποφυγή ρακεμοποίησης) σε διμεθυλοφορμαμίδιο έδωσε τον ενδιάμεσο ενεργό εστέρα, ο οποίος στη συνέχεια, αντέδρασε με την ελεύθερη αμινομάδα της NovaPEG αμινο-ρητίνης προς το αντίστοιχο αμίδιο (Σχήμα **4.2**).



Σχήμα 4.2: Μηχανισμός σχηματισμού αμιδικού δεσμού μεταξύ του αναλόγου **41** και της αμινο-ρητίνης με Ν,Ν'-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο και 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο.

Στην Εικόνα **4.2** απεικονίζονται συγκριτικά περιοχές των φασμάτων ¹³C NMR του οξιμικού παραγώγου και του προσδεδεμένου στεροειδούς επί του πολυμερούς υλικού. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση των κορυφών της πολυαιθυλενογλυκόλης στα 69.6 ppm, καθώς και η κορυφή στα 170.0 ppm η οποία ανήκει στον άνθρακα του αμιδικού δεσμού.

Εικόνα 4.2: Σύγκριση περιοχών των φασμάτων ¹³C NMR της ένωσης **41** και του ακινητοποιημένου στεροειδούς επί της ρητίνης.



<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</u>

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΠΡΕΓΝΕΝΟΛΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΕΫΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

5.1 Βιολογική αποτίμηση των συνθετικών αναλόγων της πρεγνενολόνης

5.1.1 Αντιπολλαπλασιαστική δράση των αρυλαλκυνυλοαναλόγων 5α-θ στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές LNCaP, A549 και MCF7

Η αποτίμηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των νέων αρυλαλκυνυλοαναλόγων της πρεγνενολόνης πραγματοποιήθηκε *in vitro* σε τρεις διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές:

1. Το πρώτο κυτταρικό μοντέλο είναι η σειρά LNCaP, μία από τις πλέον διαδεδομένες στην ογκολογία και ειδικότερα, στη μελέτη του καρκίνου του προστάτη. Πρόκειται για επιθηλιακά προσκολλώμενα κύτταρα, τα οποία είναι αρκετά σταθερά και διατηρούν τις κακοήθεις ιδιότητες. Το συγκεκριμένο κυτταρικό μοντέλο είναι ορμονο-εξαρτώμενο, δεδομένου ότι δεν αναπτύσσεται χωρίς την παρουσία ανδρογόνων. Αυτό είναι εμφανές από την παρουσία υψηλής συγγένειας ειδικών υποδοχέων ανδρογόνων (AR) στο κυτταρόπλασμα, αλλά και σε κλάσματα του πυρήνα τόσο στην καλλιέργεια, όσο και στους όγκους. Επίσης, υποδοχείς οιστρογόνων εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, γεγονός το οποίο υπογραμμίζει την απόκριση των κυττάρων LNCap στις εν λόγω ορμόνες. Παραδειγματικά αναφέρεται ότι in vitro η 5α-διϋδροτεστοστερόνη (5α-DHT) ενεργοποιεί την παραγωγή και έκκριση όξινης φωσφατάσης ανθρώπινου προστάτη (hPAP), καθώς και την έκφραση του ειδικού αντιγόνου του προστάτη (PSA) — δύο από τα πιο σημαντικά αντιγόνα της επιθηλιο-ειδικής διαφοροποίησης του προστάτη τα οποία υποδεικνύουν την ύπαρξη των υποδοχέων ανδρογόνων στα κύτταρα του προστάτη. Επιπλέον, αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι in vivo η συχνότητα ανάπτυξης όγκων στον προστάτη συσχετίζεται με τα επίπεδα των ανδρογόνων, ανεξαρτήτως φύλου⁴²⁹. Σε αντίθεση με άλλες κυτταρικές σειρές για τη μελέτη του ανθρώπινου προστάτη, το LNCaP είναι το μοναδικό εμπορικά διαθέσιμο μοντέλο το οποίο εκφράζει την όξινη φωσφατάση. Το πλεονέκτημά του αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία του στην ορμονική διαφοροποίηση το έχει καταξιώσει στη μελέτη της μεταγραφικής

ρύθμισης των γονιδίων της όξινης φωφατάσης του προστάτη, των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-όγκου, στη μελέτη ενδοκρινολογικών αλληλεπιδράσεων και στην ανάλυση μοριακών φαινομένων σχετιζόμενων με εξάρτηση από τις ορμόνες ή/και ανθεκτικότητα σε αυτές⁴³⁰.

2. Το δεύτερο κυτταρικό μοντέλο είναι η κυτταρική σειρά Α549, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα. Πρόκειται για βασικά κύτταρα του κυψελιδικού επιθήλιου του ανθρώπινου πνεύμονα (πνευμονοκύτταρα τύπου II) τα οποία αναπτύσσονται προσκολλώμενα και σχηματίζουν μονοστοιβάδες. Τα κύτταρα αυτά είναι πλακώδη και είναι υπεύθυνα για τη διάχυση τασιενεργών ουσιών (π.χ. νερό, ηλεκτρολύτες), οι οποίες μειώνουν την επιφανειακή τάση στις κυψελίδες των πνευμόνων, ώστε να παραμένουν διογκωμένες. Επιπρόσθετα, έχουν την ικανότητα να συνθέτουν λεκιθίνη και περιέχουν υψηλά ποσοστά μη κορεσμένων λιπαρών οξέων τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι της διφωσφοχολίνης της κυτιδίνης και είναι σημαντικά για τη συντήρηση των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Αυτός ο τρόπος φωσφολιπιδικής σύνθεσης εκδηλώνεται από κύτταρα στα οποία πραγματοποιείται σύνθεση και έκκριση πνευμονικών επιφανειοδραστικών ουσιών, όπως τα Α549. Για αυτό το λόγο, αυτή η κυτταρική σειρά χρησιμοποιείται εκταταμένα στη μελέτη της ρύθμισης της σύνθεσης τασιενεργών ουσιών, με απώτερο σκοπό τη θεραπευτική αντιμετώπιση πνευμονικών νόσων οι οποίες χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια τασιενεργών ουσιών⁴³¹. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι στα κύτταρα Α549 έχει ανιχνευθεί υποδοχέας ανδρογόνων και η παραγωγή των επιφανειοδραστικών ουσιών φαίνεται να επηρεάζεται από τη τεστοστερόνη και την 5αδιϋδροτεστοστερόνη. Πριν από μία δεκαετία περίπου, αποδείχθηκε ότι η κυτταρική σειρά Α549 εκδηλώνει ένα είδος μεταβολισμού στεροειδών - κατά τον οποίο τα ενδοκυττάρια επίπεδα της τεστοστερόνης σταθεροποιούνται, ενώ αυτά της 5αδιϋδροτεστοστερόνης μειώνονται - τονίζοντας τη σημασία αυτών των ορμονών για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των πνευμόνων⁴³². Τέλος, πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε την έκφραση των υποδοχέων ανδρογόνων κυρίως στα πνευμονοκύτταρα τύπου ΙΙ και τη σύνδεση αυτών των υποδοχέων με διάφορους τύπους καρκίνου του πνεύμονος⁴³³.

3. Το τρίτο κυτταρικό μοντέλο είναι η κυτταρική σειρά MCF7 η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη του καρκίνου του μαστού. Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί από τον αδένα του μαστού μετά από μετάσταση και επομένως, φέρουν αντιπροσωπευτικά χαρακτηριστικά του επιθήλιου του μαστού, ενώ αναπτύσσονται προσκολλώμενα ως μονοστοιβάδες. Τα κύτταρα MCF7 έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν θολωτές δομές, διαθέτουν ενδογενείς υποδοχείς οιστρογόνων (ERa) στο κυτταρόπλασμά τους οι οποίοι τους παρέχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με την 3,176-οιστραδιόλη⁴³⁴⁻⁴³⁶, ενώ παρουσιάζουν υψηλή απόκριση και στην προγεστερόνη (PgR). Παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία στην κυτοκερατίνη, ενώ δεν εκφράζουν τη δεσμίνη, την ενδοθηλίνη, τη βιμεντίνη και την όξινη πρωτεάση γλυκόζης (GAP). Η ανάπτυξη των κυττάρων MCF7 αναστέλλεται από τον α-παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα), ενώ η παρουσία αντι-οιστρογόνων διαφοροποιεί την έκκριση πρωτεϊνών οι οποίες προσδένουν τον ινσουλινο-ομοιάζοντα αυξητικό παράγοντα (IGFBP), οπότε μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας. Τέλος, παραλλαγές ή μεταλλάξεις του ανθρώπινου υποδοχέα οιστρογόνων (hER) με διαφοροποιημένη λειτουργική δραστικότητα ενδέχεται να ευθύνονται για αντίσταση στο αντι-οιστρογόνο ταμοξιφαίνη το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού⁴³⁷. Όπως καταδεικνύεται, οι υποδοχείς στεροειδών στα κύτταρα MCF7 αποτελούν το «κλειδί" στην έρευνα για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού και έχουν οδηγήσει σε αξιόλογες καινοτομίες σε αυτό το πεδίο. Το συγκεκριμένο μοντέλο έχει καθιερωθεί ως η πρώτη ορμονο-αποκρινόμενη κυτταρική σειρά για καρκίνο του μαστού και διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην άντληση νέων πληροφοριών και την εξέλιξη της γνώσης⁴³⁸.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιολογίας-Τομέας Φυσιολογίας Ανθρώπου και Ζώων του Πανεπιστημίου Αθηνών από την ομάδα της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Παναγιώτας Παπαζαφείρη. Η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίσθηκε παρουσία και απουσία των υπό μελέτη ενώσεων σε συγκεντρώσεις 0.1-100 μΜ με τη μέθοδο σουλφοροδαμίνης Β⁴³⁹. Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε η συγκέντρωση του κάθε αναλόγου η οποία προκαλεί το ήμισυ του μέγιστου βιολογικού αποτελέσματος (**IC**50), θεωρώντας ότι το 100% της ανάπτυξης επιτυγχάνεται απουσία οποιουδήποτε αναλόγου (τυφλό πείραμα). Τα

αποτελέσματα προσδιορισμού της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης παρουσιάζονται στον Πίνακα **5.1**.

Πίνακας 5.1: Αντιπολλαπλασιαστική δράση των αρυλαλκυνυλοαναλόγων της πρεγνενολόνης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές LNCaP, A549 και MCF7 (*M.E.: Μη Εξετασθέν).

<i>.</i>	IC ₅₀ (μM)						
Ένωση	LNCaP		A549		MCF7		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
HO^{+}	8.50±0.35	28.00	>50	45.80±3.39	34.78±1.87	26.44±2.91	
	>50	34.40	40.05±5.45	35.00±1.84	17.60±1.98	11.30±0.42	
ο HO 5γ	M.E. [*]	M.E.	M.E.	M.E.	M.E.	M.E.	
ο Ηο 5δ	>50	46.20	>50	>50	39.00±0.00	7.78±1.72	
ο = F ₃ C 5ε	7.90±1.84	9.11	15.77±4.06	7.20±0.87	13.48±5.54	4.42±0.78	
	26.20	24.00	29.31±21.9	28.53±3.52	31.45±4.76	18.56±2.1	

ο Ho Ho	4.67	22.00	>50	40.57±5.76	>50	>50
ο Ηο 5η	41.70±4.66	34.40	44.30±0.99	39.47±1.93	44.15±3.04	18.80±3.96
HO 5θ	19.10±0.99	17.30	>50	20.20±0.60	11.25±0.35	5.15±0.35

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.1 παρατηρούμε ότι τα νέα ανάλογα εμφανίζουν αυξημένη δραστικότητα έναντι της σειράς MCF7 σε σχέση με τις σειρές LNCaP και A549. Η παρουσία φθορίου σε π-θέση στον αρωματικό δακτύλιο (ανάλογο 5ζ) οδηγεί σε μειωμένη δραστικότητα έναντι και των τριών σειρών, σε αντίθεση με το μ-φθορο ανάλογο 5α, το οποίο εμφανίζει δράση έναντι των MCF7 κυττάρων (IC₅₀ = 26.44 \pm 2.91 μM). Συνδυασμός π-φθορο και μ-μεθυλο υποκαταστάτη (ανάλογο 5β) οδηγεί σε περαιτέρω βελτίωση της δράσης έναντι των MCF7 κυττάρων (IC₅₀ = 11.30±0.42 μM), σε αντίθεση με το ανάλογο 5η το οποίο φέρει μ-μεθυλο- και π-μεθοξυ-υποκαταστάτη και είναι λιγότερο δραστικό έναντι των MCF7 κυττάρων (IC₅₀ = 18.80 \pm 3.96 μM). Το 2,4,5-τριμεθυλοφαινυλοανάλογο 5δ εμφανίζει πολύ καλή δράση στα κύτταρα MCF7 (IC₅₀ = 7.78±1.72 μM). Επίσης, το 3αιθυνυλοφαινυλοπαράγωγο 50 παρουσιάζει παρόμοια δράση στα κύτταρα LNCaP και A549 (IC₅₀ = 19.10±0.99 μΜ και IC₅₀ = 20.20±0.60 μΜ, αντίστοιχα) και πολύ καλή δράση στα MCF7 (IC_{50} = 5.15±0.35 μM). Το 3-τριφθορομεθυλοφαινυλοανάλογο 5στ εμφανίζει βελτιωμένη δράση σε σχέση με το 3-φθοροφαινυλοανάλογο 5α στα κύτταρα A549 και MCF7 (IC₅₀ = 28.53±3.52 μM και IC₅₀ = 18.56±2.1 μM, αντίστοιχα). Τέλος, το 2-τριφθορομεθυλοφαινυλοανάλογο 5ε είναι το δραστικότερο από τα παράγωγα **5α-θ** και στις τρεις κυτταρικές σειρές LNCaP, A549 και MCF7 (IC₅₀ = 7.90±1.84, 7.20±0.87 και 4.42±0.78 μΜ, αντίστοιχα). Γενικά, διαπιστώνεται ότι σε

μονοϋποκατεστημένα παράγωγα τα οποία φέρουν ηλεκτρονιοδεκτικές ομάδες (ανάλογα **5α**, **5ε-ζ**) η *ο*-υποκατάσταση ευνοείται έναντι της *μ*-υποκατάστασης.

5.1.2 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, καταλήγουμε ότι το ανάλογο **5ε** το οποίο φέρει ως *ο*υποκαταστάτη του βενζολικού δακτυλίου την ηλεκτρονιοδεκτική τριφθορομεθυλομάδα παρουσιάζει τις βέλτιστες τιμές **IC**₅₀ για όλα τα κυτταρικά μοντέλα LNCaP, A549 και MCF7, εμφανίζοντας τη μεγαλύτερη δραστικότητα για τα παραπάνω καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με όλες τις άλλες ενώσεις. Μπορεί, επομένως, να θεωρηθεί ως ένωση-οδηγός για το σχεδιασμό και τη σύνθεση παραγώγων δεύτερης γενιάς με βελτιωμένες αντικαρκινικές ιδιότητες. Στο Διάγραμμα **5.1** φαίνεται η εξάρτηση της ανάπτυξης των συγκεκριμένων κυττάρων από τη συγκέντρωση του δραστικότερου αναλόγου **5ε**.



Διάγραμμα 5.1: Μελέτη της δοσοεξάρτησης της ανασταλτικής δράσης του αρυλαλκυνυλοαναλόγου της πρεγνενολόνης **5ε** στην ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών LNCaP, A549 και MCF7. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τεσσάρων πειραμάτων.

5.2 Βιολογική αποτίμηση των συνθετικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης

5.2.1 Νευροπροστατευτική δράση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στα κύτταρα PC12

Για την εξέταση της αποπτωτικής δράσης των νέων συνθετικών αναλόγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης πραγματοποιήθηκαν in vitro πειράματα με τη χρήση του κυτταρικού μοντέλου PC12. Πρόκειται για συμπαθοαδρενεργικά κύτταρα επίμυος με μικρό ακανόνιστο σχήμα τα οποία παράγονται στη νευρική ακρολοφία του επινεφριδίου του αρουραίου και τα οποία αποτελούν το κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενο βιολογικό σύστημα για τη μελέτη της απόπτωσης, της διαφοροποίησης και της φυσιολογίας του νευρικού κυττάρου (φαιοχρωμοκύτωμα). Τα κύτταρα PC12 συνθέτουν, αποθηκεύουν κι εκκρίνουν κατεχολαμίνες, κυρίως ντοπαμίνη (DA) και νορεπινεφρίνη (NE), ενώ διαθέτουν και χολινεργικούς υποδοχείς, στην πλειοψηφία τους νικοτινικούς. Επίσης, δεν εκφράζουν λειτουργικούς διεγερτικούς υποδοχείς γλουταμικού οξέος (NMDA receptors) και ανασταλτικούς υποδοχείς γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA_A receptors)^{440,441} και δεν είναι ικανά να μεταβολίσουν την δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) σε οιστρογόνα και ανδρογόνα⁴⁴², αλλά διαφοροποιούνται από το νευροαυξητικό παράγοντα (NGF). Η δε κυτταρική απόπτωση στον νευρικό ιστό συνιστά σημαντική διαδικασία κατά την ανάπτυξή του, συμμετέχει στην εκφύλιση του κατά τη γήρανση ή τον τραυματισμό του (υποξία, ισχαιμία, νευροτοξικές ουσίες) και ελέγχεται από την συνέργεια διαφόρων παραγόντων όπως οι Bcl-2 πρωτεΐνες, το σύστημα Fas/FasL και οι κασπάσες.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης από τον Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη, το Δρ. Ιωάννη Χαραλαμπόπουλο και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Βασίλη Μηνά. Τα κύτταρα PC12 εκτέθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού στα προς μελέτη νευροστεροειδή και μετρήθηκε η αντιαποπτωτική δράση αυτών σε συγκέντρωση 100 nM με τη μέθοδο APOPercentage. Ειδικότερα, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν επί 24 ώρες φυσιολογικά και σε συνθήκες στέρησης ορού, με συμπλήρωμα 1% BSA και παρουσία των εποξειδίων **6**, **9**, και **13** σε συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονταν από 10⁻¹¹ έως 10⁻⁵ M, ενώ η δεϋδροεπιανδροστερόνη χρησιμοποιήθηκε ως ένωση

αναφοράς. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων οδήγησε στις τιμές **IC**₅₀ οι οποίες φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα **5.2**. Ως γενικότερο συμπέρασμα προκύπτει ότι τα 17,20-σπειρο-εποξείδια **6**, **9** και **13** προστατεύουν ισχυρά τα νευρικά κύτταρα από την επαγόμενη από τη στέρηση ορού απόπτωση, σε αντίθεση με τα 3υποκατεστημένα παράγωγα της δεϋδροεπιανδροστερόνης τα οποία είχαν εξετασθεί στα πλαίσια ανάλογης μελέτης³²⁸.

_	
Ανάλογο	IC ₅₀ (nM)
HO 6	0.19±0.01
но 9	99.0±4.6
но 13	6.4±0.3
HO DHEA	0.29±0.03

Πίνακας 5.2: Βιολογική δράση των 17-σπειροκυκλικών εποξειδίων 6, 9 και 13 στα κύτταρα PC12 σε συνθήκες στέρησης ορού. Στο Σχήμα **5.1** παρουσιάζονται οι καμπύλες δοσοεξάρτησης της αντιαποπτωτικής δράσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης και των αναλόγων αυτής **6**, **9** και **13** σε κύτταρα PC12 απουσία ορού.



Σχήμα 5.1: Μελέτη της δοσοεξάρτησης της αντιαποπτωτικής δράσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης και των αναλόγων της **6, 9** και **13** σε κύτταρα PC12, απουσία ορού. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τουλάχιστον τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων, καθένα από τα οποία έχει επαναληφθεί εις τριπλούν.

Για την επιβεβαίωση της αντιαποπτωτικής δράσης των νέων αναλόγων σε συγκεντρώσεις 100 nM πραγματοποιήθηκε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS) με ένωση αναφοράς τη δεϋδροεπιανδροστερόνη. Τα κύτταρα PC12 υπεβλήθησαν σε διπλή χρώση με αννεξίνη V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο, ενώ κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε σύνολο 10.000 κυττάρων. Στο ραβδόγραμμα του Σχήματος **5.2**, ο άξονας Χ αντιπροσωπεύει την αννεξίνη V-FITC και ο άξονας Υ αντιπροσωπεύει τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων.



Σχήμα 5.2: FACS ανάλυση της αντιαποπτωτικής δράσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης και των αναλόγων της **6, 9** και **13**. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τουλάχιστον τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων, καθένα από τα οποία έχει επαναληφθεί εις τριπλούν.

Προκειμένου να κατανοήσουμε πλήρως το ρόλο τον οποίο διαδραματίζει το είδος της υποκατάστασης του στεροειδικού σκελετού στις αντιαποπτωτικές ιδιότητες των νέων νευροστεροειδών, εξετάσθηκε σειρά εμπορικά διαθέσιμων Δ⁵- και Δ⁴-ανδροστενίων σε συγκέντρωση 100 nM. Τα Δ⁵-ανδροστένια είναι τροποποιημένα στις θέσεις C3, C7, C10 και C17.

Αναλυτικότερα, αντικατάσταση της 38-ΟΗ από άτομο χλωρίου (38-χλωρο-5ανδροστεν-17-όνη), αναστροφή της υδροξυλομάδας στη C3 (3α-υδροξυ-5ανδροστεν-17-όνη) και οξείδωση της 38-υδροξυλομάδας (5-ανδροστενο-3,17-διόνη) προκαλούν απώλεια της αντιαποπτωτικής δράσης, όπως επίσης και η εισαγωγή υδροξυλομάδας στην 7α- ή 7β-θέση (3β,7α-διυδροξυ-5-ανδροστεν-17-όνη ή 3β,7βδιυδροξυ-5-ανδροστεν-17-όνη, αντίστοιχα). Παρόμοια επίδραση έχουν οι τροποποιήσεις στη θέση C17 οι οποίες περιλαμβάνουν αντικατάσταση της καρβονυλομάδας από: Ν-Ο-καρβοξυμεθυλοξίμη (36-υδροξυ-5-ανδροστενο-17-(38-υδροξυ-5-ανδροστεν-17καρβοξυμεθυλοξίμη), αιθυλενοκετάλη αιθυλενοκετάλη), ηλεκτρονιοδοτική 17β-αμινομάδα (17β-αμινο-5-ανδροστεν-3β-(5-ανδροστενο-36,176-διόλη), όλη)*,* 176-υδροξυλομάδα 176-υδροξυ-17ααιθυνυλομάδα (17α-αιθυνυλο-5-ανδροστενο-36,176-διόλη) ή 176-υδροξυ-17αμεθυλομάδα (17α-μεθυλο-5-ανδροστενο-36,176-διόλη). Η ισομερείωση του Δ^5 διπλού δεσμού σε Δ⁴ (36-υδροξυ-4-ανδροστεν-17-όνη) οδήγησε σε μη δραστικό παράγωγο και ανάλογη ήταν η βιολογική συμπεριφορά της 5-ανδροστενο-36,116διολ-17-όνης, 5-ανδροστενο-36,11α-διολ-17-όνης και της 36-υδροξυ-5-ανδροστενο-11,17-διόνης, των παραγώγων της δεϋδροεπιανδροστερόνης 5,16-ανδροσταδιενο-178-κυανο-38-όλης, 5-ανδροστεν-38-υδροξυ-16-όνης και 5-ανδροστενο-16αβρωμο-38-υδροξυ-17-όνης, καθώς και της τεστοστερόνης και του συμπλόκου τεστοστερόνης-αλβουμίνης ορού βοός. Παρόλα αυτά, σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι από τις ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν το 5-ανδροστεν-36υδροξυ-178-καρβοξυλικό οξύ και η 5,16-ανδροστεν-38-όλη εκδήλωσαν μέτρια αντιαποπτωτική δράση (Διάγραμμα 5.2).

Η μέθοδος και οι πειραματικές συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν ίδιες με αυτές οι οποίες αναφέρθηκαν για τα εξεταζόμενα συνθετικά ανάλογα της δεϋδροεπιανδροστερόνης, ενώ ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η δεϋδροεπιανδροστερόνη.



Διάγραμμα 5.2: Επίδραση των Δ⁵- και Δ⁴-ανδροστενίων στην επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση των κυττάρων PC12.

5.2.2 Αλληλεπίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 με τις ειδικές μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης

Η παραπάνω διερεύνηση των σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) κατέστησε σαφές ότι οι στερεοηλεκτρονικές απαιτήσεις για την εκδήλωση νευροπροστασίας των παραγώγων δεϋδροεπιανδροστερόνης είναι πολύ αυστηρές. Αυτό το στοιχείο είναι πιθανόν να υποδεικνύει την αλληλεπίδραση με κάποιο συγκεκριμένο υποδοχέα ή ένζυμο και κατά συνέπεια, μπορεί να βοηθήσει στην άντληση πληροφοριών για το μηχανισμό δράσης των σπειρο-εποξειδίων **6**, **9** και **13**.

Η υπόθεση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες διαπιστώσεις της ομάδας μας οι οποίες υποστηρίζουν ότι στην αντιαποπτωτική επίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης μεσολαβούν ειδικές μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης των G-πρωτεϊνών, ανεξάρτητες από τους NMDA ή GABA_A υποδοχείς³¹⁵. Όντως, όταν η δεϋδροεπιανδροστερόνη συζεύγνυται με την αλβουμίνη ορού βοός, προκύπτει ένα μόριο το οποίο δεν μπορεί να διεισδύσει στα κύτταρα PC12 και το οποίο όμως, αναστέλλει κατά 50% την κυτταρική απόπτωση σε συνθήκες στέρησης ορού (IC₅₀ = 1.5 nM) με τρόπο παρόμοιο με αυτό του ελεύθερου στεροειδούς (IC_{50} = 1.8 nM)³¹⁵. Επίσης, το ίδιο μόριο μιμείται αποτελεσματικά τη δράση της δεϋδροεπιανδροστερόνης στις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, αποτρέποντας την απενεργοποίησή τους λόγω της στέρησης ορού. Τέλος, πειράματα με επισημασμένη με τρίτιο δεϋδροεπιανδροστερόνη ([³H]DHEA) η οποία είναι προσδεδεμένη σε μεμβράνες των κυττάρων PC12 αποκάλυψαν ότι η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ραδιοαπαλλαγμένης δεϋδροεπιανδροστερόνης οδηγεί σε αντικατάσταση της [³H]DHEA από την τελευταία. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την τιμή IC₅₀ η οποία ισούται με 1.65±0.2 nM επιβεβαιώνουν ότι το εν λόγω νευροστεροειδές εκδηλώνει υψηλή συγγένεια για ειδικές μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης (mDBS). Ωστόσο, το πιο ενδιαφέρον και το πιο ενθαρρυντικό εύρημα είναι η αντικατάσταση της [³H]DHEA από τα νέα νευροστεροειδή 6, 9 και 13 με τιμές IC₅₀ = 0.04±0.002, 0.11±0.01 και 18.5±2.1 nM, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας την εξίσου ισχυρή αλληλεπίδρασή τους με τους παραπάνω υποδοχείς (Διάγραμμα 5.3).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη. Οι μεμβράνες των κυττάρων PC12 επωάσθηκαν με [³H]DHEA και παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των αναλόγων **6**, **9** και **13** (από 10⁻¹² έως 10⁻⁶ M) και στη συνέχεια, οι μεμβράνες διηθήθηκαν, εκπλύθηκαν, ξηράνθηκαν και μετρήθηκαν στον απαριθμητή *β*-σπινθηρισμών.



Διάγραμμα 5.3: Αντικατάσταση της [³H]DHEA σε μεμβράνες κυττάρων PC12 από τη δεϋδροεπιανδροστερόνη και τα σπειρο-νευροστεροειδή **6, 9** και **13**.

5.2.3 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στα κύτταρα PC12

Η στέρηση ορού στα κύτταρα PC12 προκαλεί ισχυρή καταστολή των επιπέδων των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL. Πρόσφατα, αναφέρθηκε από την ομάδα του Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη ότι συγκεντρώσεις της δεϋδροεπιανδροστερόνης της τάξης του 1 nM είναι ικανές να δράσουν νευροπροστατευτικά για τα κύτταρα PC12, ενεργοποιώντας σε ελάχιστο χρονικό διάστημα τους αντιαποπτωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και CREB, δύο αναρροϊκούς τελεστές των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2³¹⁴. Παράλληλα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα **5.4**, σε παρόμοιες συνθήκες στέρησης ορού τα ανάλογα **6**, **9** και **13** δρουν παρόμοια με τη δεϋδροεπιανδροστερόνη, διατηρώντας την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών στα κύτταρα σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά της συμπλήρωσης ορού.

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει ανάπτυξη των κυττάρων PC12 επί 12 ώρες φυσιολογικά και σε συνθήκες στέρησης ορού παρουσία 10 nM δεϋδροεπιανδροστερόνης και των αναλόγων **6**, **9** και **13**. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα τα οποία περιείχαν όλες τις πρωτεΐνες και τα επίπεδα των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL μετρήθηκαν με τη μέθοδο ανοσοστύπωσης Western, ενώ οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της ακτίνης.



Διάγραμμα 5.4: Επαγωγή της έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 σε κύτταρα PC12 από τη δεϋδροεπιανδροστερόνη και τα ανάλογα **6, 9** και **13** σε συνθήκες στέρησης ορού. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

5.2.4 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην έκκριση και παραγωγή ντοπαμίνης στα κύτταρα PC12

Έχει αναφερθεί ότι πολύ μικρές συγκεντρώσεις (της τάξης των nM) της δεϋδροεπιανδροστερόνης και του θειϊκού άλατος αυτής αυξάνουν σε χρονικό διάστημα 10 λεπτών την έκκριση κατεχολαμινών στα ντοπαμινεργικά κύτταρα PC12 μέσω αποσυναρμολόγησης του ινιδίων ακτίνης, ενώ παρατηρείται ενεργοποίηση της έκφρασης της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH), η οποία με τη σειρά της επάγει την *de novo* σύνθεση των κατεχολαμινών⁴⁴³.

Όταν τα κύτταρα PC12 εκτέθηκαν στα νέα στεροειδή **6** και **13** (σε συγκέντρωση 10⁻⁷M) και στη δεϋδροεπιανδροστερόνη για μικρές χρονικές περιόδους (5 έως 30 λεπτά), μετρήσεις της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης στο

θρεπτικό υλικό μέσω ραδιοανοσοχημικού προσδιορισμού (RIA) κατέδειξαν την εξαιρετικά ταχεία (περίπου 10 λεπτά) και στατιστικά διπλάσια αύξηση της έκκρισης ντοπαμίνης από τα σπειρο-στεροειδή (Διάγραμμα 5.3Α). Επίσης, εξετάσθηκε η επίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης και των αναλόγων 6 και 13 για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (3 έως 48 ώρες) και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της ντοπαμίνης η οποία παρουσίασε μέγιστο στις 24 ώρες (Διάγραμμα 5.3B). Κατ' επέκταση, τα νευροστεροειδή 6 και 13 επηρεάζουν άμεσα και έντονα όχι μόνο την έκκριση ντοπαμίνης, αλλά και την απαρχής σύνθεσή της στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Αυτό αποδείχθηκε από την ισχυρή επαγωγή του mRNA της υδροξυλάσης της τυροσίνης, του ενζύμου το οποίο περιορίζει την ταχύτητα βιοσύνθεσης της ντοπαμίνης (Διάγραμμα 5.3Γ), μετά από επώαση επί 6 ώρες των κυττάρων PC12 απουσία (τυφλό πείραμα) ή παρουσία των στεροειδών σε συγκέντρωση 10 nM και μέτρηση των επιπέδων mRNA στα κυτταρικά εκχυλίσματα με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Τα επίπεδα του mRNA της υδροξυλάσης της τυροσίνης συγκρίθηκαν με τα επίπεδα του mRNA της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (GAPDH).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του
Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Σχήμα 5.3.



Σχήμα 5.3: Επίδραση των DHEA, DHEAS και των σπειρο-νευροστεροειδών **6** και **13** στην έκκριση ντοπαμίνης στα κύτταρα PC12 σε (A) 5-30 λεπτά και (B) σε 3-48 ώρες. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ποσοστό επί της εκατό επί του τυφλού πειράματος (κύτταρα τα οποία δεν εκτέθηκαν στα στεροειδή). Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων. (Γ) Επίδραση των DHEA, DHEAS και των σπειρο-νευροστεροειδών **6** και **13** στην παραγωγή ντοπαμίνης στα κύτταρα PC12.

5.2.5 Αποτίμηση της ορμονικής δράσης και της επίδρασης των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στη ρύθμιση της έκφρασης των εξαρτώμενων από τους υποδοχείς οιστρογόνων γονιδίων αναφοράς

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, του μαστού ή του ενδομητρίου (ενδοκρινο-εξαρτώμενοι όγκοι) συνδέεται άμεσα με τις ενδογενείς και εξωγενείς ορμόνες, δεδομένου ότι ο ορμονο-επαγόμενος κυτταρικός πολλαπλασιασμός σχετίζεται με υψηλότερη πιθανότητα τυχαίων σφαλμάτων μετάλλαξης⁴⁴⁴. Επί παραδείγματι, η χρήση οιστρογόνων για την αντιμετώπιση μεταεμμηνοπαυσιακών σύνδρομων αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού ή του ενδομητρίου⁴⁴⁵. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη

και του ενδομητρίου παρουσιάζουν υψηλή απόκριση στα οιστρογόνα^{446,447}, ενώ είναι γνωστό ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη είναι εξαρτώμενος από οιστρογόνα και ανδρογόνα^{444,448}. Για αυτούς τους λόγους και εξαιτίας της στεροειδικής δομής τους, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη συμπληρωματικού ελέγχου των σπειρο-νευροστεροειδών **6**, **9** και **13** ως προς την εκδήλωση πιθανής ορμονικής δράσης (οιστρογονικής ή/και ανδρογονικής) στην ανάπτυξη των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη, του μαστού και της μήτρας.

Αρχικά, εξετάσθηκε η επίδραση των προαναφερόμενων αναλόγων στην έκφραση των εξαρτώμενων από τους υποδοχείς οιστρογόνων γονιδίων. Η αγωνιστική δράση για τον υποδοχέα ΕRα αξιολογείται μέσω της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης σε MCF7:D5L κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν υποκλώνο της αντίστοιχης ανθρώπινης κυτταρικής σειράς του αδενοκαρκινώματος του μαστού και έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα για να εκφράζουν το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του στοιχείου απόκρισης σε οιστρογόνα (ERE). Όπως γίνεται αντιληπτό, η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και αξιόπιστη για την αξιολόγηση διαφόρων τύπων οιστρογόνων (φυτο-οιστρογόνα, ξενο-οιστρογόνα, φαρμακευτικά οιστρογόνα και αντι-οιστρογόνα) ως αγωνιστών ή ανταγωνιστών των υποδοχέων ER⁴⁴⁹. Σύμφωνα και με προηγούμενα δεδομένα^{450,451}, επώαση των ελεύθερων οιστρογόνων κυττάρων MCF7:D5L με 3,176-οιστραδιόλη (φυσικός αγωνιστής) συγκέντρωσης 1 nM επάγει πλήρως την έκφραση της λουσιφεράσης, ενώ δεν παρατηρείται κάτι ανάλογο μετά από επώαση των κυττάρων με τις ενώσεις 9 και 13 (συγκέντρωση 1 μΜ). Παρόλα αυτά, η ένωση 6 σε συγκέντρωση 1 μΜ επάγει ασθενώς την έκφραση του γονιδίου η οποία εξαρτάται από τον υποδοχέα ERα, αφού βρέθηκε να αναστέλλεται πλήρως από το αντι-οιστρογόνο ICI 182,780 (ανταγωνιστής) το οποίο καταστέλλει την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων ER⁴⁵². Τέλος, όταν τα κύτταρα MCF7:D5L τα οποία περιείχαν 3,178-οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 1 nM επωάσθηκαν παρουσία ICI 182,780 συγκέντρωσης 1 μM, δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση της λουσιφεράσης, όπως και κατά την επώαση παρουσία των ενώσεων 6, 9 ή 13 σε συγκεντρώσεις έως 1 μΜ.

Η δράση αγωνιστή για τον υποδοχέα ΕR*θ* αξιολογείται μέσω της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης σε ΗΕΚ:ΕR*θ* κύτταρα⁴⁵³. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν κλώνο της αντίστοιχης ανθρώπινης κυτταρικής σειράς (ΗΕΚ293), η οποία

προέρχεται από νεφρούς ανθρώπινου εμβρύου, και έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα για να εκφράζουν το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του στοιχείου απόκρισης σε οιστρογόνα (ERE)⁴⁵⁴. Επώαση των ελεύθερων οιστρογόνων κυττάρων HEK:ER*θ* με 3,17*θ*-οιστραδιόλη (φυσικός αγωνιστής) συγκέντρωσης 1 nM επάγει πλήρως την έκφραση της λουσιφεράσης, ενώ δεν παρατηρείται κάτι ανάλογο μετά από επώαση των κυττάρων με τις ενώσεις **6**, **9** και **13** σε συγκεντρώσεις έως 1 μΜ. Όταν τα κύτταρα HEK:ER*θ* τα οποία περιείχαν 3,17*θ*-οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 1 nM επωάσθηκαν παρουσία ICI 182,780 (ανταγωνιστής) συγκέντρωσης 1 μΜ, δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση της λουσιφεράσης Γης αυσιφεράσης. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα της επώασης με τις ενώσεις **6** και **9**, ενώ η ένωση **13** έδρασε ασθενώς ανασταλτικά σε συγκέντρωση 1 μΜ.

Επιπρόσθετα, εξετάσθηκε η ικανότητα των νέων αναλόγων να επάγουν την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης (AlkP) στα κύτταρα Ishikawa τα οποία εκφράζουν και τους δύο τύπους των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα και ERB)⁴⁴⁷. Το εν λόγω μοντέλο είναι μια τροποποιημένη κυτταρική σειρά η οποία χρησιμοποιείται για περισσότερο από είκοσι χρόνια στη μελέτη του αδενοκαρκινώματος του ενδομητρίου και στο οποίο εκφράζονται υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης⁴⁵⁵. Επώαση των ελεύθερων οιστρογόνων κυττάρων Ishikawa με 3,178-οιστραδιόλη (φυσικός αγωνιστής) σε συγκέντρωση 0.1 nM (συγκέντρωση μετα-εμμηνοπαυσιακών επιπέδων) επάγει πλήρως την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης⁴⁴⁹, ενώ δεν παρατηρείται κάτι ανάλογο μετά από επώαση των κυττάρων με τις ενώσεις 9 και 13 σε συγκεντρώσεις 1 μΜ. Όμως, σε ίδια συγκέντρωση η ένωση 6 επάγει ασθενώς την έκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου. Όταν τα κύτταρα Ishikawa τα οποία περιείχαν 3,176-οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 0.1 nM επωάσθηκαν παρουσία ICI 182,780 (ανταγωνιστής) σε συγκέντρωση 1 μM, δεν παρατηρήθηκε έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα της επώασης με τις ενώσεις 6 και 9, ενώ η ένωση 13 έδρασε ασθενώς ανασταλτικά σε συγκέντρωση 1 μΜ.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών από το Διευθυντή Ερευνών Δρ. Μιχάλη Ν. Αλέξη, τη Δρ. Ξανθίππη Αλέξη και τη Δρ. κ. Ευφροσύνη Κατσάνου. Τα αποτελέσματα της δράσης των ανωτέρων αναλόγων ως αγωνιστών ή ανταγωνιστών

εκφράσθηκαν ως ποσοστό επί της εκατό της αγωνιστικής δράσης της 3,176οιστραδιόλης (E2) ή ως ποσοστό επί της εκατό της ανταγωνιστικής δράσης του αντιοιστρογόνου ICI 182,780 έναντι του αγωνιστή E2 με την εφαρμογή κατάλληλου μαθηματικού τύπου. Όλα τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα παρατίθενται συνοπτικά στον Πίνακα **5.3**.

Πίνακας 5.3: Ρύθμιση της έκφρασης των εξαρτώμενων από τους υποδοχείς οιστρογόνων γονιδίων αναφοράς από τα σπειρο-νευροστεροειδή **6, 9** και **13**. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστικά σημαντική δράση των ενώσεων ως αγωνιστών ή ανταγωνιστών χαρακτηρίσθηκε ως πλήρης (67-100%), μερική (34-66%) ή ασθενής (≤33%) (^{*}Μ.Σ.: Μη Σημαντική).

Ανάλογο (1μΜ)	Έκφραση λουσιφεράσης (MCF-7:D5L)		Έκφι λουσιφ (ΗΕΚ	οαση εράσης :ER <i>θ</i>)	Έκφραση αλκαλικής φωσφατάσης (Ishikawa)		
	ΕRα αγωνι- σμός (% της δράσης 1 nM E2)	ΕRα ανταγω- νισμός (% της δράσης 1 μΜ ICI)	ΕR <i>θ</i> αγωνι- σμός (% της δράσης 1 nM E2)	ΕR <i>θ</i> ανταγω- νισμός (% της δράσης 1 μΜ ICI)	ER αγωνι- σμός (% της δράσης 0.1 nM E2)	ER ανταγω- νισμός (% της δράσης 1 μΜ ICI)	
6	Ασθενής (29±1)	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Ασθενής (22±4)	Μ.Σ.	
9	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.	
13	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Ασθενής (31±8)	Μ.Σ.	Ασθενής (24±6)	

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε ότι:

 Όσον αφορά στην έκφραση της λουσιφεράσης, για συγκεντρώσεις ≤1 μΜ το ανάλογο 6 δρα ως ασθενής ERα αγωνιστής, το ανάλογο 13 δρα ως ασθενής ERβ ανταγωνιστής και το ανάλογο 9 δρα ως μη αγωνιστής/μη ανταγωνιστής και στους δύο τύπους υποδοχέων.

2) Όσον αφορά στην έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης, το ανάλογο 6 την επάγει ασθενώς, πιθανώς μέσω του υποδοχέα ΕRα, το ανάλογο 13 αναστέλλει ασθενώς την επαγόμενη από την 3,176-οιστραδιόλη έκφραση του ενζύμου, πιθανώς μέσω του υποδοχέα ER6, και το ανάλογο 9 δεν εκδήλωσε δράση σε καμία περίπτωση, όπως είναι αναμενόμενο από ένα μη αγωνιστή/μη ανταγωνιστή των υποδοχέων οιστρογόνων.

3) Ο συνδυασμός των ευρημάτων αυτών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ανάλογα 6 και 13 μάλλον επηρεάζουν την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa διαμέσου των υποδοχέων ERα και ERθ, αντίστοιχα, αλλά η δράση τους είναι ασθενής και αντίστροφη.

5.2.6 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από ενδοκρινο-εξαρτώμενους όγκους

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF7, LNCaP και Ishikawa.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα κύτταρα MCF7 εκφράζουν τους υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται με τρόπο εξαρτώμενο από τα οιστρογόνα και τους υποδοχείς τους^{450,451}. Η 3,176-οιστραδιόλη (φυσικός αγωνιστής) σε συγκεντρώσεις ≥0.1 nM προάγει πλήρως την επαγόμενη από τους υποδοχείς ERα ανάπτυξη των κυττάρων MCF7, ενώ το αντι-οιστρογόνο ICI 172,780 (ανταγωνιστής) σε συγκέντρωση 1 μM αναστέλλει πλήρως την ορμονική δράση⁴⁵¹. Αντιθέτως, τα ανάλογα **9** και **13** δεν επέδρασαν στον πολλαπλασιασμό των ελεύθερων οιστρογόνων κυττάρων MCF7, ενώ το ανάλογο **6** σε συγκέντρωση 1 μM προήγαγε ασθενώς την ανάπτυξή τους με τρόπο ο οποίος φαίνεται ότι εξαρτάται από τους υποδοχείς των οιστρογόνων. Αυτό επιβεβαιώθηκε από την πλήρη
αναστολή της ανάπτυξης από το ICI 182,780 σε συγκέντρωση 1 μΜ και άρα, η ένωση **6** είναι ένας ασθενής αγωνιστής της εξαρτώμενης από τους υποδοχείς οιστρογόνων ανάπτυξης των κυττάρων MCF7.

Στη συνέχεια, επώαση των ελεύθερων οιστρογόνων κυττάρων Ishikawa με 3,17*6*-οιστραδιόλη (φυσικός αγωνιστής) σε συγκέντρωση 0.1 nM επί τρεις ημέρες προήγαγε οριακά (15%) τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, δράση η οποία ανεστάλη παρουσία ICI 182,780 (ανταγωνιστής) σε συγκέντρωση 1 μM. Παρόμοια, οι ενώσεις **6**, **9** και **13** δεν επηρέασαν σε σημαντικό βαθμό την ανάπτυξη των ίδιων κυττάρων.

Τα κύτταρα LNCaP εκφράζουν τους υποδοχείς οιστρογόνων ERa και ERd, καθώς επίσης και ένα μεταλλαγμένο τύπο του υποδοχέα ανδρογόνων^{456,457}. Η ανάπτυξή τους προάγεται από οιστρογόνα και ανδρογόνα^{446,456}, ενώ ο υποδοχέας ERd είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από αυτά⁴⁵⁶. Παρόλα αυτά, οι γνώσεις μας για τον μηχανισμό δράσης των οιστρογόνων και των υποδοχέων ER τα οποία εμπλέκονται στην ορμονική απόκριση αυτών των κυττάρων είναι περιορισμένες^{446,456-458}. Όταν τα κύτταρα LNCaP επωάσθηκαν παρουσία 3,176-οιστραδιόλης (φυσικός αγωνιστής) σε συγκέντρωση 10 nM, παρατηρήθηκε αξιόλογη ενεργοποίηση της ανάπτυξης των κυττάρων, η οποία κατεστάλη από συγκέντρωση 10 μM του ICI 182,780 (ανταγωνιστής). Ωστόσο, τα ανάλογα **6**, **9** και **13** δεν μπόρεσαν να προάγουν την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του Διευθυντή Ερευνών Δρ. Μ. Αλέξη. Н επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 550nm, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο βρωμιούχου 3-(4,5διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)διφαινυλοτετραζολίου (MTT), και τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν ως ποσοστό επί της εκατό επί της επίδρασης της 3,178-οιστραδιόλης (E2) με την εφαρμογή κατάλληλου μαθηματικού τύπου. Τα πειραματικά δεδομένα συνοψίζονται στον Πίνακα 5.4 και καταστούν σαφές ότι κανένα από τα ανωτέρω ανάλογα δεν προάγει ουσιαστικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών σειρών MCF7, Ishikawa και LNCaP, ακόμα και σε συγκέντρωση 1 μM, γεγονός το οποίο συνηγορεί υπέρ του χαρακτηρισμού των εξεταζόμενων ενώσεων ως ασθενών αγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων.

Πίνακας 5.4: Επίδραση των σπειρο-νευροστεροειδών **6**, **9** και **13** στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από ενδοκρινο-εξαρτώμενους όγκους. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η στατιστικά σημαντική επίδραση χαρακτηρίστηκε ως πλήρης (67-100%), μερική (34-66%) ή ασθενής (≤33%) (^{*}Μ.Σ.: Μη Σημαντική).

Ανάλογο (1μΜ)	MCF7 (% of 0.1 nM E2)	Ishikawa (% of 0.1 nM E2)	LNCaP (% of 10 nM E2)
6	Ασθενής (33±11)	M.Σ.*	Μ.Σ.
9	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.
13	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.

5.2.7 Επίδραση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 στην κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων PC12, HEK293 και HT22

Η επίδραση των στεροειδών **6**, **9** και **13** στην κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκε σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές:

 Στα συμπαθοαδρενεργικά κύτταρα επίμυος PC12, τα οποία προέρχονται από φαιοχρωμοκύτωμα επινεφριδίων αρουραίου.

2. Στα επιθηλιακά κύτταρα HEK293, τα οποία προέρχονται από ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρό και τα οποία έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα με έκθεσή τους σε θραύσματα του DNA του αδενοϊού τύπου 5⁴⁵⁹. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν αρκετές από τις πρωτεΐνες οι οποίες υπάρχουν στους νευρώνες, όπως διάφορες υπομονάδες των νευροϊνιδίων (NF-L, NF-M, NF-H) και την α-ιντερνεξίνη, χαρακτηριστικό το οποίο υποδεικνύει τη μεγαλύτερη συσχέτισή τους με τους νευρώνες συγκριτικά με τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών⁴⁶⁰.

3. Στα κύτταρα νευροβλαστώματος ιππόκαμπου επίμυος ΗΤ22. Τα προαναφερόμενα κύτταρα προέρχονται από τα μητρικά κύτταρα ΗΤ4 τα οποία έχουν αθανατοποιηθεί από πρωτογενή καλλιέργεια νευρώνων ιππόκαμπου ποντικού. Η κυτταρική σειρά ΗΤ22 είναι γνωστό ότι στερείται υποδοχέων NMDA και οιστρογόνων, αλλά εκφράζει τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών^{81,461}, καθώς και χολινεργικούς δείκτες, όπως τον μεταφορέα χολίνης και την ακετυλοτρανσφεράση

της χολίνης. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι τα κύτταρα ΗΤ22 διαθέτουν λειτουργικές χολινεργικές ιδιότητες και κατά επέκταση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως *in vitro* μοντέλο για την αποσαφήνιση των μηχανισμών οι οποίοι οδηγούν στη νόσο Alzheimer's λόγω της χολινεργικής υπολειτουργίας του ιππόκαμπου⁴⁶². Ωστόσο, η κυτταρική σειρά HT22 έχει καθιερωθεί στη μελέτη της νευροτοξικότητας λόγω οξειδωτικού στρες το οποίο προκαλείται από το γλουταμικό οξύ⁴⁶³, έναν από τους κύριους παράγοντες εγκατάστασης και προαγωγής νευροεκφυλιστικών νόσων (ασθένειες Huntington, Alzheimer's και Parkinson), δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες δημιουργούνται συνήθως οδηγούν τα νευρικά κύτταρα σε απόπτωση.

Όλα τα ανωτέρω κύτταρα εκτέθηκαν σε θρεπτικό υλικό με συμπλήρωμα ορού απουσία ή παρουσία συγκεντρώσεων 0.1, 1, και 10 μΜ των συνθετικών στεροειδών **6**, **9** και **13** και μετρήθηκε η κυτταρική βιωσιμότητα μετά από 24, 48 και 72 ώρες με τη μέθοδο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)διφαινυλοτετραζολίου (MTT). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ποσοστό επί της εκατό επί του τυφλού πειράματος (κύτταρα τα οποία δεν εκτέθηκαν στα στεροειδή). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα **5.4**, και οι τρεις ενώσεις στις συγκεντρώσεις στις οποίες εξετάσθηκαν δεν επέδρασαν σημαντικά στη βιωσιμότητα καμιάς από τις χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές.



Σχήμα 5.4: Επίδραση των ενώσεων **6**, **9** και **13** στην κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων PC12, HEK293 και HT22. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, καθένα από τα οποία έχει επαναληφθεί εις τριπλούν (—•— ένωση **6**, …•… ένωση **9** και …Δ… ένωση **13**).

5.2.8 Αποτίμηση της δράσης των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 6, 9 και 13 έναντι στην αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα

Τα σπειρο-εποξείδια **6, 9 και 13** συντέθηκαν σε μεγάλη κλίμακα, προκειμένου να πραγματοποιηθούν πειράματα *in vivo* τα οποία αφορούσαν στην προστατευτική ικανότητα των παραπάνω αναλόγων έναντι της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΕΑΕ). Η ασθένεια αυτή είναι μια αυτοάνοση κατάσταση του κεντρικού νευρικού συστήματος και προέρχεται από τη διείσδυση στο εν λόγω σύστημα καταστροφικών αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων T, τα οποία προκαλούν διαδοχικά απομυελίνωση και στη συνέχεια, αξονικό και νευρωνικό εκφυλισμό.

Σε μύες στους οποίους είχε προκληθεί πειραματική (experimental) αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα από το παθογενές MOG-πεπτίδιο έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δεϋδροεπιανδροστερόνης και των εποξειδίων **6**, **9** και **13** (2 mg/μυ) επί 26 μέρες και τα πειραματόζωα παρακολουθούνταν καθημερινά ως προς τα κλινικά συμπτώματα τα οποία παρουσίαζαν (π.χ. παράλυση), αλλά και μέσω συλλογής ιστών για τη διεξαγωγή ιστολογικών εξετάσεων και μετρήσεων της απόκρισης των Τ κυττάρων και της απελευθέρωσης ωκυτοκίνης.

Η χορήγηση αυτή των παραπάνω νευροστεροειδών οδήγησε σε μειωμένο βαθμό παράλυσης και παρείχε προστασία έναντι της εγκεφαλομυελίτιδας προερχόμενης από το MOG-πεπτίδιο. Επίσης, τα νευροστεροειδή συνέβαλαν στη βελτίωση της κλινικής εικόνας και στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου (Σχήματα **5.5** και **5.6**), ενώ επιπρόσθετα καθυστέρησαν την έναρξη της ασθένειας και μείωσαν τη φλεγμονή στο κεντρικό νευρικό σύστημα.



Σχήμα 5.5: Επίδραση των ενώσεων **6**, **9** και **13** με την πάροδο του χρόνου στο μέσο κλινικό αποτέλεσμα στα πειραματόζωα.



Σχήμα 5.6: Ραβδογράμματα τα οποία δείχνουν την επίδραση των ενώσεων **6**, **9** και **13** (Α) στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, (Β) στην ημέρα έναρξης της ασθένειας και (Γ) στο μέγιστο μέσο κλινικό αποτέλεσμα.

Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των ποσοτήτων των ωκυτοκινών IFN-γ, IL-10 και IL-17 (η αύξησή της έγινε σε μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με τη ρυθμιστική IFN-γ) (Σχήμα 5.7), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η δεϋδροεπιανδροστερόνη και τα σπειρο-νευροστεροειδή 6, 9 και 13 καταστέλλουν σε σημαντικό βαθμό την παθογενή ανοσοαπόκριση ως προς την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα.



Σχήμα 5.7: Ραβδογράμματα τα οποία δείχνουν την επίδραση των ενώσεων **6**, **9** και **13** στη έκκριση της ωκυτοκίνης (Α) IFN-γ, (Β) IL-10 και (Γ) IL-17.

Χαρακτηριστική είναι προστατευτική επίδραση της ŋ δεϋδροεπιανδροστερόνης και των εποξειδίων 6, 9 κι 13 ακόμα και σε πληθυσμούς μυών οι οποίοι ήδη πάσχουν από πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα επαγόμενη από το MOG-πεπτίδιο. Εκτός από το μειωμένο βαθμό παράλυσης ο οποίος σημειώθηκε στα πειραματόζωα, συνολικά παρατηρήθηκε ότι τα παραπάνω νευροστεροειδή κατέστειλαν την εξέλιξη της ασθένειας και συνέβαλαν στη μείωση της φλεγμονής στο νωτιαίο μυελό (Σχήμα 5.8). Επιπλέον, μειώθηκαν τα επίπεδα των ωκυτοκινών IFN-γ και IL-17 οι οποίες έχουν φλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ αυξήθηκε η έκκριση της ανοσορυθμιστικής ωκυτοκίνης IL-10. Τελικά, προκύπτει ότι οι ενώσεις 6, 9 και 13, όπως και η δεϋδροεπιανδροστερόνη καταστέλλουν σημαντικά τόσο την παθογενή ανοσολογική απόκριση, όσο και τα συμπτώματα στην περίπτωση πειραματόζωων τα οποία ήδη έχουν εκδηλώσει πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα.



Σχήμα 5.8: Επιχρωματισμένα τμήματα δείγματος ιστού από το νωτιαίο μυελό τα οποία δείχνουν την επίδραση των ενώσεων **6**, **9** και **13** στη φλεγμονή η οποία προκαλείται στα πειραματόζωα από την εγκεφαλομυελίτιδα.

5.2.9 Νευροπροστατευτική δράση των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 18, 23 και 28 στα κύτταρα PC12

Τα ενθαρρυντικά πρώτα αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν σχετικά με τη νευροπροστατευτική δράση των 17-σπειρο-εποξειδίων **6**, **9** και **13** μας οδήγησαν στη σύνθεση νέων 17-σπειροκυκλικών αναλόγων. Τα νέα ανάλογα (Σχήμα **5.9**) μας έδωσαν τη δυνατότητα να μελετήσουμε την επίδραση του μεγέθους του σπειροκυκλικού δακτυλίου (**18** και **23**) και της απουσίας ετεροατόμου (**28**) από το δακτύλιο στις αντιαποπτωτικές ιδιότητες των νευροστεροειδών.



Σχήμα 5.9: Δομές των 17-σπειροκυκλικών αναλόγων 18, 23 και 28.

Τα κύτταρα PC12 εκτέθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού στα προς μελέτη νευροστεροειδή και μετρήθηκε η αντιαποπτωτική δράση αυτών. Ειδικότερα, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν επί 48 ώρες φυσιολογικά και σε συνθήκες στέρησης ορού, με συμπλήρωμα 1% BSA και παρουσία των ενώσεων **18**, **23**, και **28**, ενώ η δεϋδροεπιανδροστερόνη και ο νευροαυξητικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις αναφοράς. Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος **5.10**, τα 17 σπειροκυκλικά ανάλογα **18**, **23** και **28** προστατεύουν ισχυρά τα νευρικά κύτταρα από την επαγόμενη από τη στέρηση ορού απόπτωση. Για την επιβεβαίωση της αντιαποπτωτικής δράσης των νέων αναλόγων πραγματοποιήθηκε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής με ενώσεις αναφοράς τη δεϋδροεπιανδροστερόνη και το νευροαυξητικό παράγοντα. Τα κύτταρα PC12 υπεβλήθησαν σε διπλή χρώση με αννεξίνη V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο, ενώ κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε σύνολο 10.000 κυττάρων (Σχήμα **5.10**).



Σχήμα 5.10: (A) FACS ανάλυση της αντιαποπτωτικής δράσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης, του νευροαυξητικού παράγοντα και των αναλόγων **18**, **23** και **28**, (B) ο άξονας X αντιπροσωπεύει την αννεξίνη V-FITC και ο άξονας Y τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων. Οι τιμές αναπαριστούν την μέση τιμή±σταθερή απόκλιση τουλάχιστον τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων, καθένα από τα οποία έχει επαναληφθεί εις τριπλούν.

5.2.10 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας τα βιολογικά αποτελέσματα (*in vitro* και *in vivo*) για τα συνθετικά στεροειδή **6**, **9** και **13**, μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

 Προστατεύουν τα νευρικά κύτταρα από την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση, εμφανίζοντας τιμές IC₅₀ στην περιοχή των 0.1-100 nM.

2) Αλληλεπιδρούν ισχυρά με τις ειδικές μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης, εμφανίζοντας τιμές K_d της τάξης των nM. Η δε σειρά της αποπτωτικής τους ισχύος (6>13>9) είναι παρόμοια με τη σειρά της αλληλεπίδρασής τους με τους μεμβρανικούς υποδοχείς της δεϋδροεπιανδροστερόνης (6>9>13), γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι η αποτελεσματική πρόσδεση σε αυτούς είναι ο κυρίαρχος παράγοντας ο οποίος και επηρεάζει την αποπτωτική δράση των συγκεκριμένων στεροειδών³²⁸.

 Μιμούνται τη δράση των ενδογενών νευροστεροειδών, επάγοντας την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2.

4) Δεν ενεργοποιούν τους υποδοχείς οιστρογόνων ΕRα και ERθ για συγκεντρώσεις έως 1 μΜ και άρα, δεν εμφανίζουν οιστρογονική δράση.

5) Δεν εμπλέκονται στην οιστρογονική επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης η οποία εξαρτάται από το οιστρογονο-αποκρινόμενο στοιχείο, παρουσία προ- ή μεταεμμηνοπαυσιακών επιπέδων 3,17*β*-οιστραδιόλης.

 Δεν επιδρούν στην ανάπτυξη των κυττάρων Ishikawa, MCF7 και LNCaP σε σημαντικό βαθμό.

7) Καταστέλλουν σημαντικά την παθογενή ανοσολογική απόκριση και τα συμπτώματα της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΕΑΕ) και επομένως, εκδηλώνουν προστατευτική δράση έναντι της ασθένειας πριν ή ακόμα και μετά την εκδήλωσή της.

Κατά συνέπεια, διαπιστώνεται ότι τα νέα σπειρο-εποξυ-στεροειδή αποτελούν μόρια-οδηγούς για την περαιτέρω σύνθεση και ανάπτυξη νευροπροστατευτικών ενώσεων, συμβάλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο στη φαρμακευτική αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών νόσων³²⁸.

Σε συνέχεια της μελέτης αυτής, οι πρώτες βιολογικές δοκιμές για την αντιαποπτωτική δράση των αναλόγων **18, 23** και **28** έδειξαν ότι τα νέα αυτά στεροειδή προστατεύουν ισχυρά τα νευρικά κύτταρα από την επαγόμενη από τη στέρηση ορού απόπτωση, ενώ αναμένεται ο έλεγχος της αντιποπτωτικής δράσης των ενώσεων **32** και **35**.

5.3 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με την ακινητοποιημένη σε πολυμερές 7(Ζ)-(Ο-καρβοξυμεθυλ)οξίμη της 3β-υδροξυ-ανδροστ-5-εν-7,17-διόνης

5.3.1 Αλληλεπίδραση της δεϋδροεπιανδροστερόνης με τους μεμβρανικούς υποδοχείς του νευροαυξητικού παράγοντα

Πειράματα σε μεμβράνες των κυττάρων ΗΕΚ293 με ραδιοεπισημασμένη δεϋδροεπιανδροστερόνη παρείχαν τις πρώτες ενδείξεις για τη φυσική αλληλεπίδραση του νευροστεροειδούς με τους μεμβρανικούς υποδοχείς TrkA and p75^{NTR} του νευροαυξητικού παράγοντα (NGF)²⁵¹. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αυτήν την υπόθεση, όπως προαναφέρθηκε, συνθέσαμε την 7(Z)-(Oκαρβοξυμεθυλ)οξίμη της 3θ-υδροξυ-ανδροστ-5-εν-7,17-διόνης (DHEA-7-CMO) η ομοιοπολικά οποία στη συνέχεια, προσδέθηκε στην αμινο-ρητίνη πολυαιθυλενογλυκόλης (NovaPEG αμινο-ρητίνη). Το αντίστοιχο ακινητοποιημένο παράγωγο της δεϋδροεπιανδροστερόνης το οποίο προέκυψε και το οποίο φαίνεται στο Σχήμα 5.11, ελέγχθηκε ως προς την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με τις προαναφερόμενες πρωτεΐνες.



Σχήμα 5.11: Δομή ακινητοποιημένου σε πολυμερές παραγώγου της δεϋδροεπιανδροστερόνης **41**.

Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυση ανοσοστύπωσης Western των ιζημάτων με ειδικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες TrkA και p75^{NTR} έδειξαν ότι η ακινητοποιημένη δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA-7-CMO-PEG) καταβύθισε τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες TrkA και p75^{NTR} (Σχήμα **5.12(I)**). Προεπώαση των ανασυνδυασμένων πρωτεΐνών με περίσσεια δεϋδροεπιανδροστερόνης ή νευροαυξητικού παράγοντα ακύρωσε την ικανότητα της DHEA-7-CMO-PEG να καταβυθίσει τους δύο υποδοχείς (Σχήμα **5.12(I)**). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν όταν κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα HEK293 επιμολυσμένα με συμπληρωματικά DNA (cDNA) των πρωτεϊνών TrkA και p75^{NTR} επωάσθηκαν με ακινητοποιημένη δεϋδροεπιανδροστερόνη (Σχήμα **5.12(II)**). Επώαση της DHEA-7-CMO-PEG με κύτταρα PC12 ή ολόκληρο εγκέφαλο αρουραίου δεν οδήγησε σε καταβύθιση των υποδοχέων (Σχήμα **5.12(III)**). Επώαση της DHEA-7-CMO-PEG με εκχυλίσματα από μη επιμολυσμένα κύτταρα HEK293 ή με κύτταρα HEK293 επιμολυσμένα με φορείς οι οποίοι δεν έφεραν ένθεμα επίσης δεν οδήγησαν σε πρωτεϊνική καταβύθιση. Τέλος, το τυφλό πείραμα πραγματοποιήθηκε παρουσία μόνο της NovaPEG αμινο-ρητίνης, οπότε δεν καταβυθίσθηκαν οι συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες (Σχήμα **5.12**). Η παρουσία των υποδοχέων TrkA και p75^{NTR} στα επιμολυσμένα κύτταρα HEK293^{TrkA} και HEK293^{p75NTR}, στα κύτταρα PC12 και σε νωπό εγκέφαλο αρουραίου επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο ανοσοστύπωσης Western και με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων των πρωτεϊνών TrkA και p75^{NTR}, ενώ η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης αποτέλεσε την ένωση αναφοράς²⁵¹.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη.



Σχήμα 5.12: Καταβύθιση των μεμβρανικών υποδοχέων TrkA και p75^{NTR} από ακινητοποιημένη δεϋδροεπιανδροστερόνη. Το προσδεδεμένο στην αμινο-ρητίνη στεροειδές επωάσθηκε με (Ι) ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες TrkA και p75^{NTR}, (ΙΙ) με εκχυλίσματα από επιμολυσμένα κύτταρα HEK293^{TrkA} HEK293^{p75NTR} και (ΙΙΙ) κύτταρα PC12 και νωπό εγκέφαλο αρουραίου. Τα πλακίδια σημειωμένα με **A** υποδηλώνουν ανάλυση με τη μέθοδο ανοσοστύπωσης Western με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων των πρωτεϊνών TrkA και p75^{NTR} των ιζημάτων και με **B** με τη χρήση ολόκληρων των λυμάτων. (DB: ακινητοποιημένη δεϋδροεπιανδροστερόνη, B: NovaPEG αμινορητίνη, DB-DHEA, DB-NGF: προ-επώαση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με δεϋδροεπιανδροστερόνη ή με NGF, αντίστοιχα, P: στερεό, S: υπερκείμενο)

5.3.2 Συμπεράσματα

Από τα ανωτέρω καθίσταται σαφές ότι το ακινητοποιημένο σε πολυμερές παράγωγο της δεϋδροεπιανδροστερόνης καταβυθίζει αποτελεσματικά τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες TrkA και p75^{NTR} από εκχυλίσματα προερχόμενα από κύτταρα, τα οποία εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς. Αυτό υποδηλώνει ότι η δεϋδροεπιανδροστερόνη εκδηλώνει τις νευροτροφικές της ιδιότητες μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασής της με τους μεμβρανικούς υποδοχείς TrkA και p75^{NTR} του νευροαυξητικού παράγοντα και ενεργοποιεί καταρροϊκά σηματοδοτικά μονοπάτια τους. Η ενεργοποίηση αυτή παρεμποδίζει την απόπτωση των θετικών στο νευροαυξητικό παράγοντα αισθητήριων και συμπαθητικών νευρώνων. Τα δεδομένα αυτά συμβάλλουν στην αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης και στην αποκωδικοποίηση της πολύπλευρης δραστικότητάς της και σε άλλα περιφερειακά βιολογικά συστήματα.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</u>

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 17-ΕΠΟΞΥ-ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗ ΔΕΫΔΡΟΕΠΙΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

6.1 Γενικές μέθοδοι

Σε μια προσπάθεια να συσχετισθούν τα *in vitro* αποτελέσματα των ενώσεων **6**, **9** και **13** με τη βιοδραστική τους διαμόρφωση εφαρμόσθηκαν αλγόριθμοι υπολογιστικής χημείας για την εξεύρεση των ενεργειακά ευνοϊκών διαμορφώσεων, ενώ περαιτέρω τα προκύπτοντα διαμορφομερή εξετάσθηκαν σε σχέση με τα φασματοσκοπικά NOE πειραματικά δεδομένα.

Η υπολογιστική ανάλυση υλοποιήθηκε σε σταθμό εργασίας Silicon Graphics O2 με χρήση του λογισμικού πακέτου QUANTA 97 (Molecular Simulations Inc) με εφαρμογή του πεδίου δυνάμεων CHARMm. Η διηλεκτρική σταθερά θεωρήθηκε ίση με ε=1, προκειμένου να προσομοιωθεί το περιβάλλον του CDCl₃ το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις φασματοσκοπικές μελέτες και να είναι δυνατή η σύγκριση των θεωρητικών υπολογισμών με τα πειραματικά δεδομένα. Οι αρχικές δομές ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά με τη χρήση των αλγορίθμων απότομης κατάδυσης (steepest descents), συζυγών κλίσεων (conjugate gradient) και Powell. Στη συνέχεια, ο προσανατολισμός της ευέλικτης υδροξυλομάδας διερευνήθηκε με συστηματική περιστροφή (grid scan search) γύρω από τις δίεδρες γωνίες τ₁ (17C-20C-21C-O) και τ₂ (20C-21C-O-H). Διερευνήθηκε συστηματικά το εύρος τιμών 0° έως 360°, μεταβάλλοντας σε κάθε βήμα τη γωνία κατά 10°. Περαιτέρω βελτιστοποίηση των προκύπτοντων διαμορφομερών έγινε με την εφαρμογή του αλγόριθμου steepest descents με κριτήριο σύγκλισης (convergence criterion) 0.001 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹.

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφο Varian 600 MHz με χρήση αισθητήρα 5-mm [¹H {¹⁵N-³¹P} 5mm PFG Autox]. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το CDCl₃, ενώ η συγκέντρωση των δειγμάτων ήταν της τάξεως των 10 mM. Η λήψη και επεξεργασία των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών και των αλγόριθμων επεξεργασίας του λογισμικού VNMRJ της Varian. Η αποτίμηση των ενώσεων έγινε με τη βοήθεια των δισδιάστατων φασμάτων ¹H-¹H DQF-COSY, ¹H-¹³C HSQC και ¹H-¹³C HMBC, τα οποία ελήφθησαν με την τεχνική διαβαθμισμένου

πεδίου (field gradients). Όσον αφορά στα πειράματα NOESY, βρέθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος μίξης ήταν 150 ms. Το φαινόμενο NOE δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μεταξύ πυρήνων οι οποίοι γειτνιάζουν χωρικά, χωρίς να συνδέονται με αλληλεπιδράσεις βαθμωτής σύζευξης μέσω δεσμών. Συνεπώς, τα ίχνη του δισδιάστατου φάσματος NMR (2D ¹H-¹H NOESY) συσχετίζονται απευθείας με τις ενδομοριακές αποστάσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φίλτρο για την επιλογή των πιθανότερων βιοδραστικών διαμορφώσεων από το σύνολο των ευνοϊκών διαμορφομερών τα οποία προκύπτουν από την υπολογιστική ανάλυση.

6.2 Διαμορφωτική ανάλυση

Η αρχική διαμόρφωση των ενώσεων **6**, **9** και **13** βασίσθηκε στην κρυσταλλική δομή της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA)⁴⁶⁴, σύμφωνα με την οποία: α) οι δακτύλιοι Α και Γ υιοθετούν διαμόρφωση ανάκλιντρου, β) ο δακτύλιος Β έχει διαμόρφωση σχεδόν ιδανικού ημιανάκλιντρου, ενώ γ) ο πενταμελής δακτύλιος Δ έχει διαμόρφωση 14*α* φακέλου.

Οι αρχικές δομές βελτιστοποιήθηκαν ενεργειακά, ενώ ακολούθως ο διαμορφωτικός χώρος των ενώσεων **9** και **13** διερευνήθηκε συστηματικά σε σχέση με τον προσανατολισμό της ευέλικτης υδροξυλομάδας με ταυτόχρονη περιστροφή γύρω από τις δίεδρες γωνίες τ₁ (C17-C20-C21-O) και τ₂ (C20-C21-O-H).

Η μεταβολή της δυναμικής ενέργειας ως συνάρτηση των δίεδρων γωνιών τ_1 και τ_2 απεικονίζεται στους ενεργειακούς χάρτες του Σχήματος **6.1** για τις ενώσεις **9** και **13**. Τα διαμορφομερή τα οποία υποδεικνύονται με τα γράμματα **A**-**E** και **A'-E'** αντιστοιχούν στις διαμορφώσεις ελάχιστης ενέργειας των ενώσεων **9** και **13**, αντίστοιχα (Σχήμα **6.2**). Οι ισοενεργειακές καμπύλες καθορίζουν τα ενεργειακά φράγματα τα οποία πρέπει να υπερπηδηθούν, προκειμένου για τη μετάβαση από μία ευνοϊκή διαμόρφωση σε άλλη και έχουν σχεδιασθεί με βήμα 1.5 kcal/mol με ανώτατο όριο ενέργειας 15 kcal/mol από τα τοπικά ελάχιστα. Στον Πίνακα **6.1** αναγράφονται οι τιμές ενέργειας και οι τιμές των δίεδρων γωνιών τ_1 και τ_2 για τις ευνοϊκές διαμορφώσεις οι οποίες προέκυψαν από τη διαμορφωτική ανάλυση.



Σχήμα 6.1: Ενεργειακοί χάρτες για τις ενώσεις **9** και **13** οι οποίοι προέκυψαν μετά από περιστροφή των δίεδρων γωνιών τ₁ και τ₂ με βήμα αύξησης κατά 10°. Οι σημαντικότερες NOE αλληλεπιδράσεις οι οποίες καταγράφηκαν πειραματικά υποδεικνύονται με βέλη. Οι ισοενεργειακές καμπύλες έχουν σχεδιασθεί με βήμα 1.5 kcal/mol με ανώτατο όριο ενέργειας 15 kcal/mol από τα τοπικά ελάχιστα.



Σχήμα 6.2: Διαμορφομερή ελαχίστης ενέργειας των ενώσεων **9** (**A**-**E**) και **13** (**A**'-**E**') όπως προέκυψαν μετά από συστηματική περιστροφή (grid scan) γύρω από τις δίεδρες γωνίες τ₁ (17C-20C-21C-O) και τ₂ (20C-21C-O-H).

Διαμ ε	ιορφομερή νώσεων	Τιμές ενέργειας (kcal/mol)	Δίεδρη γωνία τ ₁ (°)	Δίεδρη γωνία τ₂ (°)
	Α	24.7	-58	-13
	В	37.9	-48	-161
9	Г	31.5	82	-20
	Δ	38.5	95	180
	E	36.2	-164	165
	Α'	24.9	59	14
	B'	38.7	43	166
13	Г'	31.2	-75	15
	Δ'	35.5	-86	-175
	E'	36.5	173	171

Πίνακας 6.1: Τιμές ενέργειας και δίεδρων γωνιών τ₁ και τ₂ οι οποίες αντιστοιχούν στα ενεργειακά ευνοϊκά διαμορφομερή των εποξειδίων **9** και **13**.

Η διαμορφωτική ανάλυση υπέδειξε ότι η 21-υδροξυλομάδα μπορεί να προσανατολισθεί είτε προς την *α*-επιφάνεια του στεροειδικού σκελετού (διαμορφομερή **Γ**, **Δ** για την ένωση **9** και **Γ'**, **Δ'** για την ένωση **13**) είτε προς τη *β*επιφάνεια του στεροειδικού σκελετού (διαμορφομερή **Α**, **Β** για την ένωση **9** και **Α'**, **Β'** για την ένωση **13**) ή τέλος, να λάβει μια εκτεταμένη ισημερινή διάταξη (διαμορφομερή **Ε** και **Ε'** για τις ενώσεις **9** και **13**, αντίστοιχα).

Σε ό,τι αφορά στην ένωση 9, οι πιο ενδιαφέρουσες αλληλεπιδράσεις ΝΟΕ παρατηρήθηκαν αφενός μεν μεταξύ του εποξειδικού πρωτονίου 20-Η και των πρωτονίων 12-Η του στεροειδικού δακτυλίου Γ, αφετέρου δε ανάμεσα στα πρωτόνια 21-Η και τα πρωτόνια 16-Η του δακτυλίου Δ. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πλέον ενεργειακά ευνοϊκή διαμόρφωση **Α** προσανατολίζει την 21-ΟΗ προς τον εποξειδικό δακτύλιο, ευνοώντας το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου, η ύπαρξη του οποίου δεν ανιχνεύθηκε ωστόσο με φασματοσκοπία NMR. Τα υπόλοιπα διαμορφομερή (**B**-**E**) θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τις ΝΟΕ αλληλεπιδράσεις και ειδικότερα τα σήματα μεταξύ των πρωτονίων 12-Η και 16-Η, ευνοώντας μια ελεύθερη περιστροφή της υδροξυλομάδας. Εξάλλου, όπως φαίνεται από τον ενεργειακό χάρτη του Σχήματος **6.1** για τη μετάβαση από τη διαμόρφωση **Ε** προς τη διαμόρφωση **Δ** ή προς τη διαμόρφωση **Β** απαιτείται η υπερπήδηση ενός ενεργειακού φραγμού ελάχιστης τιμής (περίπου 3 kcal/mol).

Σε ό,τι αφορά στην ένωση **13**, καταγράφηκαν οι ακόλουθες ΝΟΕ αλληλεπιδράσεις: α) μεταξύ των πρωτονίων 21-Η και των πρωτονίων 16*α/β*-Η του δακτυλίου Δ, β) του πρωτονίου 20-Η και των πρωτονίων της 18-μεθυλομάδας, καθώς και γ) μια σχετικά ασθενής ΝΟΕ αλληλεπίδραση μεταξύ ενός από τα 21-Η και των πρωτονίων 18-Η. Η ευνοϊκότερη ενεργειακά διαμόρφωση **A'** δεν ικανοποιεί τα καταγραφέντα ΝΟΕ σήματα ανάμεσα στα πρωτόνια 21-Η και 16*α/β*-Η, ενώ επίσης ευνοεί το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου, καθώς η υδροξυλομάδα προσεγγίζει το οξυγόνο του εποξειδικού δακτυλίου. Όμως, τα πειραματικα δεδομένα δεν υποδεικνύουν τη δημιουργία τέτοιου δεσμού. Όπως και στην ένωση **9**, από τα σήματα ΝΟΕ δεν προκύπτει η επικράτηση κάποιου διαμορφομερούς μεταξύ των **Β'**-**Ε'**, ενώ και πάλι η μετάβαση μεταξύ των ευνοϊκών διαμορφώσεων **Β'**, **Δ'**, **Ε'** δε φαίνεται να παρεμποδίζεται (Σχήμα **6.1**).

6.3 Υπέρθεση των ενώσεων 6, 9, 13 και της δεϋδροεπιανδροστερόνης

Κατόπιν, για λόγους σύγκρισης έγινε υπέρθεση των αναλόγων **9** και **13**, αντίστοιχα, και των δομών του αναλόγου **6** και της δεϋδροεπιανδροστερόνης (Σχήμα **6.3**). Παρατηρείται ότι σε όλες τις ενώσεις ο στεροειδικός σκελετός και η 3*6*-ΟΗ ευθυγραμμίζονται πλήρως, οπότε στις ενώσεις **6** και **9** οι οξιρανικοί δακτύλιοι λαμβάνουν ψευδο-ισημερινή διάταξη και επικαλύπτονται, ενώ στην ένωση **13** ο εποξειδικός δακτύλιος τοποθετείται κάτω από το επίπεδο του στεροειδικού συστήματος. Τέλος, στη δεϋδροεπιανδροστερόνη το 17-καρβονύλιο υιοθετεί ισημερινή διάταξη με το άτομο του οξυγόνου να ισαπέχει από το οξυγόνο του εποξειδίου τόσο στην 17*α*-, όσο και στη 17*6*-διαμόρφωση.



Σχήμα 6.3: Υπέρθεση των ενεργειακά ευνοϊκών διαμορφομερών **Ε** και **Ε'** των ενώσεων **9** και **13**, αντίστοιχα, με τις ενεργειακά βελτιστοποιημένες δομές του αναλόγου **6** και της δεϋδροεπιανδροστερόνης.

Στον Πίνακα **6.2** καταγράφονται οι τιμές ενέργειας για τα διαμορφομερή **Ε** και **Ε'**, όπως προέκυψαν από την συστηματική διαμορφωτική ανάλυση, αλλά και για το ανάλογο **6** και τη δεϋδροεπιανδροστερόνη μετά από ενεργειακή ελαχιστοποίηση.

Πίνακας 6.2: Τιμές ενέργειας των διαμορφομερών Ε και Ε' των ενώσεων 9 και 13, αντίστοιχα, καθώς και της ένωσης 6 και της δεϋδροεπιανδροστερόνης μετά από εφαρμογή αλγορίθμων ελαχιστοποίησης της ενέργειας.

Διαμορφομερή ενώσεων	Τιμές ενέργειας (kcal/mol)	
6	35.5	
9		
(διαμορφομερές Ε)	36.2	
13		
(διαμορφομερές Ε')	36.5	
DHEA	41.4	

6.4 Συμπεράσματα

Οι προεκτάσεις της ανωτέρω διαμορφωτικής ανάλυσης σε βιολογικό επίπεδο μπορεί να παρέχει εξηγήσεις για τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων. Καταρχάς, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές K_d για την αλληλεπίδραση των εποξυ-αναλόγων **6**, **9** και **13** με τις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης (mDBS), καθίσταται εμφανές ότι οι ενώσεις **6** και **9** παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια για τις συγκεκριμένες θέσεις από την δεϋδροεπιανδροστερόνη, οπότε συμπεραίνουμε ότι ευνοείται η 17*β* διάταξη του εποξειδικού οξυγόνου σε σχέση με την αντίθετη 17*α*.

Επίσης, όλες οι παραπάνω ενώσεις πρακτικά δεν ενεργοποιούν τους υποδοχείς της 3,176-οιστραδιόλης (ERα και ER6), τουλάχιστον για συγκεντρώσεις έως 1 μΜ. Αυτό αποδίδεται στην έλλειψη φαινολικού υδροξυλίου η οποία δεν τους επιτρέπει να σχηματίσουν τους απαραίτητους δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu353 και Arg394 (ERα) ή με τα αμινοξέα Glu305 και Arg346 (ERβ) και επομένως, να μιμηθούν αποτελεσματικά την 3,176-οιστραδιόλη στην πρόσδεσή της με τους εν λόγω υποδοχείς 451,465,466. Ως εκ τούτου, μειώνεται ή ακόμα και εκμηδενίζεται η πιθανότητα να σχηματίσει το οξυγόνο του οξιρανικού δακτυλίου τους αναμενόμενους δεσμούς υδρογόνου με το αμινοξύ His524 (ERa) ή His475 (ERb) και να επέλθει σταθεροποίηση του ενδιάμεσου συμπλόκου αγωνιστή-υποδοχέα. Ειδικότερα, αυτό είναι πιθανότερο να συμβεί στην περίπτωση του υποδοχέα ER6, εξαιτίας της εγγενώς μικρότερης σταθερότητας του σχηματιζόμενου συμπλόκου αγωνιστή-υποδοχέα, αλλά και των αυστηρότερων περιορισμών για βέλτιστη τοποθέτηση μέσα στη σχετικά λιγότερο ευρύχωρη κοιλότητα του συγκεκριμένου υποδοχέα⁴⁶⁵. Ανάλογες εκτιμήσεις μπορούν να γίνουν και για την ένωση **6** η οποία εκδηλώνει δράση ασθενούς αγωνιστή για τον υποδοχέα ERa και μη αγωνιστή για τον υποδοχέα ER6. Η δομική διαφορά των ενώσεων 6 και 9 εντοπίζεται στην παρουσία της υδροξυμεθυλενομάδας στη θέση C20 η οποία ενδέχεται να μην επιτρέπει την πρόσδεση του αναλόγου 9 στους υποδοχείς. Από την άλλη πλευρά, στην ένωση 13 η αντίθετη στερεοχημεία του οξιρανικού δακτυλίου συγκριτικά με την ένωση 9 θεωρείται πιθανότατα υπεύθυνη για το χαρακτηρισμό του αναλόγου ως ασθενούς ανταγωνιστή για τον υποδοχέα ΕRB και ως μη ανταγωνιστή για τον υποδοχέα ERα.

Συνοπτικά, καταλήγουμε ότι η χρήση της ομάδας του εποξειδίου ως υποκαταστάτη στην 17-θέση της δεϋδροεπιανδροστερόνης εμφανίζει πλεονεκτήματα. Το σχετικά μικρό μέγεθος του ετεροκυκλικού αυτού δακτυλίου δεν παρεμποδίζει, αλλά διευκολύνει την αλληλεπίδραση των παραγώγων με τις μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης της δεϋδροεπιανδροστερόνης, ενώ η σχετικά μικρή δραστικότητά του μειώνει την πιθανότητα μη εκλεκτικής αλκυλίωσης στα κύτταραστόχους. Επιπλέον, η εισαγωγή της υδροξυλομάδας στη θέση 21 επιτρέπει τη συμμετοχή σε δεσμούς υδρογόνου και επομένως, δυνητικά βελτιώνει την πρόσδεση των αντίστοιχων παραγώγων στους παραπάνω μεμβρανικούς υποδοχείς.

<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7</u>

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 Όργανα και διατάξεις

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H, ¹³C και ¹⁹F) ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρα Varian 300 και 600 MHz. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και ως πρότυπα για τη λήψη των φασμάτων ήταν CDCl₃ και CD₃OD. Τα φάσματα ¹³C ελήφθησαν με την τεχνική ευρείας ετεροπυρηνικής αποσύζευξης. Οι σταθερές σύζευξης (*J*) εκφράζονται σε Hz, ενώ τα σύμβολα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή της πολλαπλότητας των κορυφών είναι: (s) απλές, (bs) ευρείες απλές, (d) διπλές, (dd) διπλές διπλών, (ddd) διπλές διπλών διπλών, (t) τριπλές και (m) πολλαπλές.

Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS) ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο UHPLC LC-MSⁿ Orbitrap Velos-Thermo μέσω των τεχνικών ηλεκτροψεκασμού (ESI, Electron Spray Ionisation) και χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ακετονιτρίλιο και μεθανόλη καθαρότητας HPLC, καθώς και μείγματα των παραπάνω οργανικών διαλυτών με μικρή ποσότητα ουσιών οι οποίες υποβοηθούν τον ιονισμό (οξικό οξύ για την ευκολότερη λήψη φασμάτων σε θετικό δυναμικό και υδροξείδιο του αμμωνίου για τον ευκολότερο ιονισμό σε αρνητικό δυναμικό).

Τα φάσματα υπερύθρου (IR) κατεγράφησαν σε όργανο Bruker FT-IR (με μονάδα ATR).

Οι στοιχειακές αναλύσεις έγιναν στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών σε όργανο Perkin Elmer Series II CHNS/O 2400.

Τα σημεία τήξεως ελήφθησαν σε όργανο Gallenkamp Sanyo.

Οι γωνίες στροφής ελήφθησαν σε όργανο Perkin Elmer Polarimeter 341 (λάμπα: 589 nm, θερμοκρασία: 20°C).

7.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Για τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες επιστρωμένες με γέλη πυριτίου και φθορίζον υλικό F₂₅₄. Η εμφάνιση των κηλίδων έγινε με: α) έκθεση σε υπεριώδες φως, β) ψεκασμός με διάλυμα φωσφομολυβδαινικού αμμωνίου (PMA) και θέρμανση της πλάκας. Ο χρωματογραφικός καθαρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε με τη χρήση υλικού πλήρωσης silica gel (200-400 mesh) και αργό.

7.3 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Σε όλες τις συνθετικές πορείες χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά αντιδραστήρια τα οποία ήταν εμπορικά προϊόντα των εταιρειών Aldrich, Fluka και Merck, καθαρότητας ≥ 98%. Επίσης, η απομάκρυνση της υγρασίας από τους διαλύτες έγινε με απόσταξή τους υπό αργό (το τετραϋδροφουράνιο αποστάζεται από νάτριο παρουσία βενζοφαινόνης, ενώ το διχλωρομεθάνιο από υδρίδιο του ασβεστίου) ή με ξήρανση παρουσία μοριακών κόσκινων. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αδρανείς συνθήκες.

7.4 Μέθοδοι





Σε διάλυμα πρεγνενολόνης (2.0 6.32 mmol) άνυδρο σε g, διμεθυλοφορμαμίδιο (40 mL) προστίθεται ιμιδαζόλιο (1.08 g, 15.8 mmol) στους 0°C. Μετά από 30 λεπτά, ακολουθεί προσθήκη t-βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοχλωριδίου (4.74 mL, 15.8 mmol) στην ίδια θερμοκρασία και η αντίδραση αναδεύεται στους 50°C επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται υπό ψύξη κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 1 λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από ανακρυστάλλωση από αιθανόλη.

Απόδοση: 3.5 g (ποσοτικά)

Σ.Τ.: 125-129°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: 6.04° (c = 0.00149, CHCl₃)

Rf: 0.68, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 8:2

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.60 (s, 3H, 19-CH₃), 0.81-0.91 (m, 3H), 0.98 (s, 3H, 18-CH₃), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.15-2.03 (m, 14H), 2.10 (s, 3H, 21-CH₃), 2.14-2.38 (m, 2H), 2.49 (t, J = 8.99 Hz, 1H, 17α-H), 3.48-3.58 (m, 1H, 3α-H), 5.12 (d, J = 4.95 Hz, 1H, 6-H), 7.33-7.44 (m, 6H, αρωματικά), 7.66-7.72 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 11.3, 13.3, 19.1, 20.8, 22.7, 24.3, 27.0, 28.5, 29.2, 31.5, 31.2, 32.6, 35.5, 36.01, 36.08, 39.0, 44.3, 54.4, 56.7, 63.8, 73.1, 121.7, 127.4, 129.8, 133.5, 135.7, 141.2, 209.9.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₃₇H₅₀O₂Si (%): C= 80.09, H= 9.08. Ευρ.: C= 79.68, H= 8.79.

38-(t-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστενο-178-καρβοξυλικό οξύ (2)



Σε διάλυμα της ένωσης **1** (3.2 g, 5.83 mmol) σε μείγμα διοξάνιου (77 mL) και νερού (23 mL) προστίθεται στους 0°C υποβρωμιώδες νάτριο (158 mL, παρασκευάζεται από ανάμειξη 131 mL απεσταγμένου νερού που περιέχει 15.3 g καυστικού νατρίου με 84.6 mL διοξάνιου και 5.08 mL στοιχειακού βρωμίου στους 0°C). Το μείγμα αναδεύεται επί 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί ψύξη στους 0°C, προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος θειώδους νατρίου και ανάδευση του μείγματος επί 10 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Κατόπιν, το μείγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **2** λαμβάνεται με τη μορφή λευκών κρυστάλλων και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο.

Απόδοση: 3.22 g (**99 %**)

Σ.Τ.: 195-198°C

 $[\alpha]_D^{20}$: -19.33° (*c* = 0.00119, CHCl₃)

IR: 3237, 2935, 1720 cm⁻¹

Rf: 0.46, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.76 (s, 3H, 19-CH₃), 0.85-0.96 (m, 3H), 1.02 (s, 3H, 18-CH₃), 1.10 (m, 9H, C(CH₃)₃), 1.18-2.21 (m, 16H), 2.38 (t, *J* = 9.31 Hz, 1H, 17α-H), 3.52-3.63 (m, 1H, 3α-H), 5.15 (d, *J* = 4.89 Hz, 1H, 6-H), 7.36-7.47 (m, 6H, αρωματικά), 7.70-7.74 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.1, 19.1, 19.3, 20.8, 23.4, 24.5, 26.9, 31.8, 31.9, 36.5, 37.2, 38.0, 42.4, 44.1, 50.0, 55.0, 56.2, 73.2, 120.7, 127.4, 129.4, 134.7, 135.7, 141.3, 179.8.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₃₆H₄₈O₃Si (%): C= 77.65, H= 8.69. Ευρ.: C= 77.34, H= 9.07.

Ν-Μεθοξυ,*Ν*-μεθυλο-3*β*-(*t*-βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστενο-17*β*καρβοξαμίδιο (3)



Σε διάλυμα της ένωσης **2** (1.2 g, 2.16 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (12 mL), προστίθενται διαδοχικά υδροχλωρικό αλάτι της *N,O*-διμεθυλοϋδροξυλαμίνης (316 mg, 3.23 mmol), 4-διμεθυλαμινοπυριδίνη (395 mg, 3.23 mmol) και υδροχλωρικό αλάτι του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιϊμιδίου (620 mg, 3.23 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται επί 12 ώρες. Μετα την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μείγμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με 5% υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Η ένωση **3** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 95:5).

Απόδοση: 1.21 g (94%)

Σ.Τ.: 143-146°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -45.73° (c = 0.00164, CHCl₃)

IR: 2932, 1652 cm⁻¹

Rf: 0.26, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.73 (s, 3H, 19-CH₃), 0.77-0.88 (m, 3H), 0.98 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.14-2.38 (m, 16H), 2.72-2.75 (m, 1H, 17α-H), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.48-3.58 (m, 1H, 3α-H), 3.63 (s, 3H, NOCH₃), 5.13 (d, J = 5.01 Hz, 1H, 6-H), 7.32-7.44 (m, 6H, αρωματικά), 7.66-7.69 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.7, 19.0, 19.3, 20.8, 24.7, 24.8, 26.9, 31.74, 31.78, 31.8, 36.4,
37.1, 38.8, 42.4, 42.3, 45.0, 49.9, 50.7, 56.6, 60.7, 73.0, 120.8, 127.30, 127.33,
129.29, 129.32, 134.61, 134.64, 135.59, 135.60, 141.1, 174.7.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₃₈H₅₃NO₃Si (%): C= 76.08, H= 8.90, N= 2.33. Ευρ.: C= 76.24, H= 9.07, N= 2.63.

Γενικές μέθοδοι για τη σύνθεση των προστατευμένων αρυλαλκυνυλοαναλόγων της πρεγνενολόνης

Μέθοδος Α: Σε διάλυμα *n*-βουτυλολιθίου (1.6M σε εξάνιο, 2 eq) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.33M, 1 mL) προστίθενται -40°C στους τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (2 eq) και το μείγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία επί 15 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη του κατάλληλου αλκυνίου (3 eq) στους -40°C και μετά από 1 ώρα, προστίθεται διάλυμα του αμιδίου Weinreb 3 (1 eq) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 mL) στην ίδια θερμοκρασία. Το μείγμα αναδεύεται, ενώ η θερμοκρασία αφήνεται να ανέλθει στους -10°C εντός 3 ωρών. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα φέρεται στους 0°C και ακολούθως, προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου. Το μείγμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα και η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Ο καθαρισμός των ενώσεων γίνεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση.

Μέθοδος Β: Σε διάλυμα *n*-βουτυλολιθίου (1.6M σε εξάνιο, 2 eq) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.33M, 1 mL) προστίθεται στους -40°C το κατάλληλο αλκύνιο (3 eq) και το μείγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία επί 1 ώρα. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη διαλύματος του αμιδίου Weinreb **3** (1 eq) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 mL) και ανάδευση του μείγματος, ενώ η θερμοκρασία αφήνεται να ανέλθει στους -10°C εντός 3 ωρών. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα φέρεται στους 0°C και ακολούθως, προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου. Το μείγμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα και η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Ο καθαρισμός των ενώσεων γίνεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση.

1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(3φθοροφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4α)



Η ένωση **4α** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο A** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (400 mg, 0.66 mmol) και 1-αιθυνυλο-3-φθοροβενζολίου (0.24 mL, 2.0 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 95:5).

Απόδοση: 300 mg (**68%**)

IR: 2932, 2198, 1663 cm⁻¹

Rf: 0.47, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 95:5

¹**H NMR (CDCl₃)**: δ 0.71 (s, 3H, 19-CH₃), 0.83-0.92 (m, 3H), 0.98 (s, 3H, 18-CH₃), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.12-2.38 (m, 16H), 2.69 (t, *J* = 8.57 Hz, 1H, 17*α*-H), 3.50-3.58 (m, 1H, 3*α*-H), 5.13 (d, *J* = 4.39 Hz, 1H, 6-H), 7.07-7.23 (m, 2H, αρωματικά), 7.28-7.42 (m, 8H, αρωματικά), 7.66-7.69 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.2, 19.1, 19.3, 20.9, 22.2, 24.3, 26.9, 31.6, 31.7, 36.4, 37.2, 38.4, 42.4, 45.1, 49.9, 56.8, 64.8, 73.0, 88.9 (d, *J* = 3.5 Hz), 89.4, 117.9 (d, *J* = 21.1 Hz), 119.3 (d, *J* = 23.1 Hz), 120.7, 122.0 (d, *J* = 9.2 Hz), 127.3 (d, *J* = 2.0 Hz), 128.61, 128.65, 129.37, 129.39, 130.2 (d, *J* = 8.5 Hz), 134.6, 134.7, 135.6, 135.7, 141.1, 162.1 (d, *J* = 248.2 Hz), 188.5.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ (-111.94)-(-111.86) (m).

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₄₄H₅₂FO₂Si [M+H]⁺ 659.3715, ευρεθέν 659.3709, υπολογισθέν για C₄₄H₅₁FO₂SiNa [M+Na]⁺ 681.3535, ευρεθέν 681.3523. 1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(3-μεθυλο-4φθοροφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4β)



Η ένωση **4β** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο A** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (100 mg, 0.16 mmol) και 4-αιθυνυλο-1-φθορο-2μεθυλοβενζολίου (0.06 mL, 0.50 mmol) και παραλαμβάνεται ως κίτρινο κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 95:5).

Απόδοση: 80 mg (**71%**)

Σ.Τ.: 143-145°C

IR: 2932, 2190, 1651 cm⁻¹

Rf: 0.26, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.72 (s, 3H, 19-CH₃), 0.84-0.95 (m, 3H), 1.00 (s, 3H, 18-CH₃), 1.07 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.14-2.19 (m, 14H), 2.28 (d, *J* = 3.56 Hz, 3H, CH₃), 2.30-2.39 (m, 2H), 2.69 (t, *J* = 8.76 Hz, 1H, 17α-H), 3.50-3.60 (m, 1H, 3α-H), 5.14 (d, *J* = 5.09 Hz, 1H, 6-H), 6.98-7.04 (m, 1H, αρωματικό), 7.34-7.46 (m, 7H, αρωματικά), 7.68-7.71 (m, 4H, αρωματικά).

¹³**C** NMR (CDCl₃): δ 13.2, 14.3 (d, J = 3.7 Hz), 19.1, 19.4, 20.9, 22.3, 24.3, 26.9, 31.7, 31.82, 31.85, 36.5, 37.2, 38.4, 42.4, 45.1, 49.9, 56.9, 64.9, 73.1, 88.9 (d, J = 1.4 Hz), 90.4 (d, J = 0.9 Hz), 115.7 (d, J = 23.4 Hz), 115.9 (d, J = 3.9 Hz), 120.7, 125.8 (d, J = 18.3 Hz), 127.42, 127.45, 129.41, 129.44, 132.5 (d, J = 8.8 Hz), 134.77, 134.81, 135.75, 135.76, 136.2 (d, J = 6.0 Hz), 141.2, 162.5 (d, J = 252.1 Hz), 188.9.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ (-111.43)-(-111.34) (m).

HR-MS (ESI+): υπολογίσθηκε για C₄₅H₅₄FO₂Si [M+H]⁺ 673.3872, ευρεθέν 673.3878, υπολογισθέν για C₄₅H₅₃FO₂SiNa [M+Na]⁺ 695.3691, ευρεθέν 695.3696. 1-[3*6*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*6*-υλο]-3-(4μεθοξυφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4γ)



Η ένωση **4γ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο B** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (100 mg, 0.16 mmol) και 1-αιθυνυλο-4-μεθοξυβενζολίου (0.12 mL, 0.83 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

Απόδοση: 99 mg (**89%**)

Σ.Τ.: 159-160°C

IR: 2932, 2180, 1636 cm⁻¹

Rf: 0.29, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 95:5

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.71 (s, 3H, 19-CH₃), 0.82-0.92 (m, 3H), 0.98 (s, 3H, 18-CH₃), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.12-2.38 (m, 16H), 2.68 (t, *J* = 8.68 Hz, 1H, 17α-H), 3.48-3.59 (m, 1H, 3α-H), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (d, *J* = 4.73 Hz, 1H, 6-H), 6.88 (d, *J* = 8.84 Hz, 2H, αρωματικά), 7.34-7.44 (m, 6H, αρωματικά), 7.51 (d, *J* = 8.82 Hz, 2H, αρωματικά), 7.67-7.69 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.2, 19.1, 19.4, 20.9, 22.4, 24.4, 27.0, 31.78, 31.85, 31.88, 36.5, 37.2, 38.5, 42.4, 45.1, 50.0, 55.4, 56.9, 64.8, 73.1, 89.2, 92.1, 112.1, 114.3, 120.8, 127.4, 127.5, 129.40, 129.44, 134.77, 134.82, 134.89, 135.8, 141.3, 161.5, 189.0.
HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₄₅H₅₅O₃Si [M+H]⁺ 671.3915, ευρεθέν 671.3913, υπολογισθέν για C₄₅H₅₄O₃SiNa [M+Na]⁺ 693.3734, ευρεθέν 693.3731.

1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(2,4,5τριμεθυλοφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4δ)



Η ένωση **4δ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο A** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (200 mg, 0.33 mmol) και 1-αιθυνυλο-2,4,5-τριμεθυλοβενζολίου (148 mg, 1.0 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 95:5).

Απόδοση: 103 mg (**45%**)

Σ.Τ.: 74-76°C

IR: 2932, 2184, 1656 cm⁻¹

Rf: 0.60, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 95:5

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.75 (s, 3H, 19-CH₃), 0.85-0.93 (m, 3H), 1.01 (s, 3H, 18-CH₃), 1.09 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.13-2.16 (m, 14H), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.30-2.36 (m, 2H), 2.42 (m, 3H, CH₃), 2.71 (t, *J* = 8.70 Hz, 1H, 17α-H), 3.51-3.61 (m, 1H, 3α-H), 5.15 (d, *J* = 4.28 Hz, 1H, 6-H), 7.02 (s, 1H, αρωματικό), 7.30-7.45 (m, 7H, αρωματικά), 7.69-7.71 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.0, 19.1, 19.4, 19.8, 20.1, 20.9, 22.6, 24.5, 26.9, 31.77, 31.83, 31.86, 36.5, 37.2, 38.7, 42.4, 45.1, 50.0, 56.9, 64.8, 73.2, 91.0, 92.6, 117.1, 120.7, 127.41, 127.43, 129.40, 129.42, 131.1, 134.2, 134.4, 134.74, 134.78, 135.72, 135.73, 139.4, 139.9, 141.3, 189.0.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₄₇H₅₉O₂Si [M+H]⁺ 683.4279, ευρεθέν 683.4289, υπολογισθέν για C₄₇H₅₈O₂SiNa [M+Na]⁺ 705.4098, ευρεθέν 705.4108. 1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(2τριφθορομεθυλοφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4ε)



Η ένωση **4ε** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο B** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (100 mg, 0.16 mmol) και 1-αιθυνυλο-2τριφθορομεθυλοβενζολίου (0.07 mL, 0.50 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 98:2).

Απόδοση: 112 mg (**95%**)

IR: 2931, 2206, 1664 cm⁻¹

Rf: 0.44, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.75 (s, 3H, 19-CH₃), 0.86-0.92 (m, 3H), 1.00 (s, 3H, 18-CH₃), 1.09 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.15-2.72 (m, 16H), 2.73 (t, *J* = 8.82 Hz, 1H, 17α-H), 3.52-3.62 (m, 1H, 3α-H), 5.15 (d, *J* = 4.39 Hz, 1H, 6-H), 7.35-7.45 (m, 6H, αρωματικά), 7.51-7.59 (m, 2H, αρωματικά), 7.69-7.73 (m, 6H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.1, 19.4, 20.8, 22.6, 24.5, 26.99, 29.6, 30.1, 31.7, 31.8, 31.9, 36.5, 37.2, 38.2, 42.4, 45.5, 49.9, 56.8, 64.7, 73.2, 85.6, 93.1, 118.5 (d, *J* = 2.3 Hz), 120.7, 123.1 (q, *J* = 272.5 Hz), 126.1 (q, *J* = 5.0 Hz), 127.41, 127.44, 129.40, 129.43, 130.1, 131.6 (d, *J* = 0.8 Hz), 132.5 (q, *J* = 31.1 Hz), 134.7 (d, *J* = 2.0 Hz), 135.3, 135.72, 135.73, 141.3, 188.9.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ -62.1 (bs).

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₄₅H₅₂F₃O₂Si [M+H]⁺ 709.3683, ευρεθέν 709.3689, υπολογισθέν για C₄₅H₅₁F₃O₂SiNa [M+Na]⁺ 731.3503, ευρεθέν 731.3510. 1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(3τριφθορομεθυλοφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4στ)



Η ένωση **4στ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο B** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (100 mg, 0.16 mmol) και 1-αιθυνυλο-3τριφθορομεθυλοβενζολίου (0.07 mL, 0.50 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 98:2).

Απόδοση: 70 mg (**59%**)

IR: 2931, 2206, 1663 cm⁻¹

Rf: 0.61, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.74 (s, 3H, 19-CH₃), 0.84-0.94 (m, 3H), 1.00 (s, 3H, 18-CH₃), 1.07 (m, 9H, C(CH₃)₃), 1.15-2.40 (m, 16H), 2.72 (t, *J* = 8.68 Hz, 1H, 17α-H), 3.50-3.60 (m, 1H, 3α-H), 5.14 (d, *J* = 4.83 Hz, 1H, 6-H), 7.34-7.45 (m, 6H, αρωματικά), 7.52 (t, *J* = 7.82 Hz, 1H, αρωματικό), 7.68-7.74 (m, 6H, αρωματικά), 7.80 (bs, 1H, αρωματικό).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.4, 19.1, 19.4, 21.0, 22.3, 24.4, 26.8, 27.0, 31.7, 31.83, 31.87, 36.5, 37.2, 38.5, 42.4, 45.2, 50.0, 57.0, 64.9, 73.1, 88.3, 89.8, 120.7, 121.3, 123.4 (q, J = 271.0 Hz), 127.0 (q, J = 3.8 Hz), 127.42, 127.45, 129.2, 129.4 (q, J = 4.0 Hz), 129.41, 129.44, 131.3 (q, J = 33.0 Hz), 134.76, 134.78, 135.74, 135.75, 135.8 (q, J = 1.2 Hz), 141.3, 188.7.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ -63.4 (bs).

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₄₅H₅₂F₃O₂Si [M+H]⁺ 709.3683, ευρεθέν 709.3702, υπολογισθέν για C₄₅H₅₁F₃O₂SiNa [M+Na]⁺ 731.3503, ευρεθέν 731.3525.
1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(4φθοροφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4ζ)



Η ένωση **4ζ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο B** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (100 mg, 0.16 mmol) και 1-αιθυνυλο-4-φθοροβενζολίου (60 mg, 0.50 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 98:2).

Απόδοση: 72 mg (**66%**)

IR: 2933, 2203, 1658 cm⁻¹

Rf: 0.68, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.73 (s, 3H, 19-CH₃), 0.85-0.94 (m, 3H), 1.00 (s, 3H, 18-CH₃), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.14-2.39 (m, 16H), 2.70 (t, *J* = 8.66 Hz, 1H, 17α-H), 3.50-3.60 (m, 1H, 3α-H), 5.14 (d, *J*= 4.80 Hz, 1H, 6-H), 7.07 (t, *J* = 8.63 Hz, 2H, αρωματικά), 7.35-7.45 (m, 6H, αρωματικά), 7.53-7.58 (m, 2H, αρωματικά), 7.68-7.71 (m, 4H, αρωματικά). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.2, 19.1, 19.4, 21.0, 22.3, 24.3, 26.9, 27.0, 31.7, 31.82, 31.85, 36.5, 37.2, 38.5, 42.4, 45.2, 49.9, 57.0, 64.8, 73.1, 89.1 (d, *J* = 1.4 Hz), 89.8, 116.1 (d, *J* = 22.3 Hz), 116.3 (d, *J* = 3.5 Hz), 120.8, 127.41, 127.43, 129.40, 129.43, 134.73, 134.77, 135.1 (d, *J* = 8.8 Hz), 135.72, 135.73, 141.2, 163.8 (d, *J* = 253.6 Hz), 188.8. ¹⁹F NMR (CDCl₃): δ (-106.92)-(-106.83) (m). 1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(2-μεθυλο-4μεθοξυφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4η)



Η ένωση **4η** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο A** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (200 mg, 0.33 mmol) και 1-αιθυνυλο-2-μεθυλο-4μεθοξυβενζολίου (146 mg, 1.0 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 98:2).

Απόδοση: 207 mg (**91%**)

Σ.Τ.: 66-69°C

IR: 2932, 2183, 1654 cm⁻¹

Rf: 0.43, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.76 (s, 3H, 19-CH₃), 0.88 (bs, 3H), 1.02 (s, 3H, 18-CH₃), 1.09 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.16-2.38 (m, 16H), 2.49 (s, 3H, CH₃), 2.70-2.72 (m, 1H, 17α-H), 3.58 (bs, 1H, 3α-H), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 5.17 (bs, 1H), 6.72-6.78 (m, 2H, αρωματικά), 7.41-7.51 (m, 7H, αρωματικά), 7.71 (bs, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.0, 19.3, 20.87, 20.97, 22.5, 24.4, 26.9, 31.7, 31.8, 36.5, 37.2, 38.6, 42.4, 45.0, 49.9, 55.2, 56.8, 64.8, 73.1, 91.2, 92.9, 111.6, 112.0, 115.3, 120.7, 127.38, 127.40, 129.38, 129.39, 134.65, 134.69, 135.4, 135.7, 141.2, 144.3, 161.4, 188.9.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₄₆H₅₇O₃Si [M+H]⁺ 685.4071, ευρεθέν 685.4096, υπολογισθέν για C₄₆H₅₆O₃SiNa [M+Na]⁺707.3891, ευρεθέν 707.3916. 1-[3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17*θ*-υλο]-3-(3αιθυνυλοφαινυλο)-2-προπυν-1-όνη (4θ)



Η ένωση **40** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη **Μέθοδο A** με χρήση του αμιδίου Weinreb **3** (200 mg, 0.33 mmol) και 1,3-διαιθυνυλοβενζολίου (0.14 mL, 1.0 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

Απόδοση: 104 mg (**47%**)

IR: 2932, 2194, 1661 cm⁻¹

Rf: 0.58, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.73 (s, 3H, 19-CH₃), 0.85-0.92 (m, 3H), 1.00 (s, 3H, 18-CH₃), 1.08 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.14-2.40 (m, 16H), 2.71 (t, *J* = 8.65 Hz, 1H, 17α-H), 3.13 (s, 1H, C=C*H*), 3.51-3.61 (m, 1H, 3α-H), 5.15 (d, *J* = 4.74 Hz, 1H, 6-H), 7.32-7.72 (m, 14H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.1, 19.3, 20.9, 22.3, 24.3, 27.0, 31.7, 31.8, 36.4, 37.1, 38.5, 42.4, 45.1, 49.9, 56.9, 64.9, 73.1, 78.6, 82.1, 89.37, 89.43, 120.68, 120.74, 122.9, 127.40, 127.43, 128.7, 129.39, 129.41, 132.9, 133.9, 134.71, 134.74, 135.7, 136.0, 141.2, 188.8.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₄₆H₅₃O₂Si [M+H]⁺ 665.3809, ευρεθέν 665.3824, υπολογισθέν για C₄₆H₅₂O₂SiNa [M+Na]⁺ 687.3629, ευρεθέν 687.3641.

Γενική μέθοδος αποπροστασίας των ενώσεων 4α-θ

Σε διάλυμα προστατευμένου στεροειδούς σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (0.05-0.06 M) προστίθεται στάγδην στους 0 °C υδροφθορική πυριδίνη (10 eq) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται νερό στους 0 °C και μετά από 5 λεπτά, το μείγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση επλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Ο καθαρισμός των ενώσεων γίνεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση.

176-[3-(3-Φθοροφαινυλο)- 1-οξο -2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-36-όλη (5α)



Η ένωση **5α** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4α** (293 mg, 0.45 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ ακετόνη 9:1).

Απόδοση: 75 mg (**40%**)

Σ.Τ.: 131-132°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -29.21° (c = 0.09583, CHCl₃)

IR: 3460, 2933, 2202, 1650 cm⁻¹

R_f: 0.33, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 8:2

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.73 (s, 3H, 19-CH₃), 0.99 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05-2.38 (m, 19H), 2.71 (t, *J* = 8.64 Hz, 1H, 17α-H), 3.46-3.53 (m, 1H, 3α-H), 5.33 (d, *J* = 4.78 Hz, 1H, 6-H), 7.10-7.38 (m, 4H, αρωματικά).

¹³**C** NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.3, 20.9, 22.3, 24.3, 31.5, 31.7, 31.8, 36.5, 37.2, 38.4, 42.1, 45.1, 49.9, 56.9, 64.9, 71.5, 89.0 (d, *J* = 3.4 Hz), 89.3, 118.0 (d, *J* = 21.2 Hz), 119.4 (d, *J* = 23.0 Hz), 121.2, 121.9 (d, *J* = 9.3 Hz), 128.6 (d, *J* = 3.3 Hz), 130.3 (d, *J* = 8.4 Hz), 140.7, 162.2 (d, *J* = 248.1 Hz), 188.8.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ (-112.15)-(-112.09) (m).

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₈H₃₄FO₂ [M+H]⁺ 421.2537, ευρεθέν 421.2525.

17*6*-[3-(3-Μεθυλο-4-φθοροφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-3*6*-όλη (5β)



Η ένωση **5β** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4β** (36 mg, 0.05 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

Απόδοση: 11 mg (**47%**)

Σ.Τ.: 138-140°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -57.61° (*c* = 0.04166, CHCl₃)

IR: 3307, 2928, 2193, 1643 cm⁻¹

Rf: 0.57, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 95:5

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.74 (s, 3H, 19-CH₃), 1.01 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05-2.04 (m, 16H), 2.18-2.23 (m, 1H), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.32-2.40 (m, 2H), 2.71 (t, *J* = 8.58 Hz, 1H, 17α-H), 3.48-3.58 (m, 1H, 3α-H), 5.36 (d, *J* = 4.22 Hz, 1H, 6-H), 7.00 (t, *J* = 8.80 Hz, 1H, αρωματικά), 7.36-7.41 (m, 2H, αρωματικά).

¹³**C NMR (CDCl₃):** δ 13.3, 14.3 (d, *J* = 3.4 Hz), 19.4, 21.0, 22.4, 24.4, 31.6, 31.8, 31.9, 36.5, 37.3, 38.5, 42.2, 45.1, 50.1, 57.0, 64.8, 71.7, 88.8 (d, *J* = 1.4 Hz), 90.5, 115.7 (d, *J* = 23.4 Hz), 115.9 (d, *J* = 3.9 Hz), 121.3, 125.8 (d, *J* = 18.3 Hz), 132.5 (d, *J* = 8.8 Hz), 136.2 (d, *J* = 6.0 Hz), 140.7, 162.6 (d, *J* = 252.1 Hz), 189.0.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ (-111.34)-(-111.30) (m).

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₉H₃₆FO₂ [M+H]⁺435.2694, ευρεθέν 435.2683.

176-[3-(4-Μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-36-όλη (5γ)



Η ένωση **5γ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4γ** (76 mg, 0.11 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

Απόδοση: 11 mg (**23%**)

IR: 3395, 2928, 2180, 1654 cm⁻¹

Rf: 0.40, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.75 (s, 3H, 19-CH₃), 1.01 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05-2.41 (m, 19H), 2.71 (t, J = 8.75 Hz, 1H, 17α-H), 3.48-3.59 (m, 1H, 3α-H), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 5.36 (d, J = 5.00 Hz, 1H, 6-H), 6.90 (d, J = 8.80 Hz, 2H, αρωματικά), 7.52 (d, J = 8.79 Hz, 2H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.4, 21.0, 22.4, 24.4, 31.6, 31.8, 31.9, 36.6, 37.2, 38.5, 42.2, 45.1, 50.1, 55.4, 57.0, 64.8, 71.7, 89.2, 92.2, 112.0, 114.3, 121.4, 134.9, 140.8, 161.6, 188.9.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₉H₃₇O₃ [M+H]⁺433.2664, ευρεθέν 433.2734.

176-[3-(2,4,5-Τριμεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-36-όλη (5δ)



Η ένωση **5δ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4δ** (99 mg, 0.15 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1).

Απόδοση: 41 mg (**64%**)

Σ.Τ.: 101-102°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -79.59° (*c* = 0.07916, CHCl₃)

IR: 3506, 2931, 2184, 1644 cm⁻¹

Rf: 0.13, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.75 (s, 3H, 19-CH₃), 1.00 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05-2.04 (m, 16H), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 2.28-2.36 (m, 3H), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.72 (t, *J* = 8.58 Hz, 1H, 17α-H), 3.48-3.56 (m, 1H, 3α-H), 5.35 (d, *J* = 3.91 Hz, 1H, 6-H), 7.01 (bs, 1H, αρωματικό), 7.29 (bs, 1H, αρωματικό).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.0, 19.4, 19.8, 20.1, 21.0, 22.6, 24.4, 31.5, 31.7, 31.9, 36.5, 37.2, 38.6, 42.2, 45.1, 50.0, 56.8, 64.9, 71.7, 91.1, 92.7, 117.0, 121.3, 131.1, 134.2, 134.4, 139.5, 140.0, 140.7, 189.1.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₃₁H₄₀O₂Na [M+Na]⁺ 467.2921, ευρεθέν 467.2903.

17*6*-[3-(2-Τριφθορομεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-3*6*-όλη (5ε)



Η ένωση **5ε** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4ε** (100 mg, 0.14 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 75:25).

Απόδοση: 35 mg (**53%**)

Σ.Τ.: 61-62°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -38.18° (*c* = 0.01833, CHCl₃)

IR: 3364, 2932, 2205, 1661 cm⁻¹

Rf: 0.13, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.75 (s, 3H, 19-CH₃), 1.00 (s, 3H, 18-CH₃), 1.04-2.41 (m, 19H), 2.74 (t, J = 8.82 Hz, 1H, 17α-H), 3.47-3.57 (m, 1H, 3α-H), 5.35 (d, J = 5.04 Hz, 1H, 6-H), 7.51-7.59 (m, 2H, αρωματικά), 7.70-7.73 (m, 2H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.5, 19.6, 21.2, 22.8, 24.8, 31.8, 32.0, 32.1, 36.8, 37.4, 38.5, 42.4, 45.8, 50.2, 57.1, 65.0, 71.9, 85.9, 93.3, 118.8 (d, J = 2.1 Hz), 121.5, 123.4 (q, J = 273.6 Hz), 126.4 (q, J = 5.1 Hz), 130.4, 131.9 (d, J = 0.9 Hz), 132.5 (q, J = 31.2 Hz), 135.6, 141.0, 189.3.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ -62.2 (bs).

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₉H₃₄F₃O₂ [M+H]⁺ 471.2505, ευρεθέν 471.2497.

176-[3-(3-Τριφθορομεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-3*6*-όλη (5στ)



Η ένωση **5στ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4στ** (60 mg, 0.08 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 75:25).

Απόδοση: 18 mg (**47%**)

Σ.Τ.: 175-178°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -29.19° (*c* = 0.03083, CHCl₃)

IR: 3489, 2922, 2206, 1648 cm⁻¹

Rf: 0.13, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.75 (s, 3H, 19-CH₃), 1.01 (s, 3H, 18-CH₃), 1.07-2.41 (m, 19H), 2.74 (t, J = 8.66 Hz, 1H, 17α-H), 3.48-3.58 (m, 1H, 3α-H), 5.35 (d, J = 4.88 Hz, 1H, 6-H), 7.53 (t, J = 7.81 Hz, 1H, αρωματικό), 7.68-7.75 (m, 2H, αρωματικά), 7.80 (bs, 1H, αρωματικό).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.4, 21.0, 22.4, 24.4, 31.6, 31.7, 31.9, 36.5, 37.2, 38.5, 42.2, 45.3, 50.0, 56.9, 64.9, 71.7, 88.4, 89.7, 121.3, 123.4 (d, *J* = 272.7 Hz), 127.0 (q, *J* = 3.7 Hz), 129.3, 129.4 (q, *J* = 3.9 Hz), 131.3 (q, *J* = 33.1 Hz), 135.8 (d, *J* = 0.9 Hz), 140.8, 188.7.

¹⁹**F NMR (CDCl₃):** δ -63.5 (bs).

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₉H₃₄F₃O₂ [M+H]⁺ 471.2505, ευρεθέν 471.2496.

176-[3-(4-Φθοροφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-36-όλη (5ζ)



Η ένωση **5ζ** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4ζ** (65 mg, 0.09 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 75:25).

Απόδοση: 24 mg (**58%**)

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -48.57° (*c* = 0.03500, CHCl₃)

IR: 3256, 2935, 2213, 1638 cm⁻¹

Rf: 0.16, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.75 (s, 3H, 19-CH₃), 1.01 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05-2.33 (m, 19H), 2.72 (t, J = 8.55 Hz, 1H, 17α-H), 3.49-3.55 (m, 1H, 3α-H), 5.36 (d, J = 5.08 Hz, 1H, 6-H), 7.05-7.11 (m, 2H, αρωματικά), 7.54-7.59 (m, 2H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.6, 19.6, 21.3, 22.6, 24.7, 31.9, 32.0, 32.1, 36.7, 37.5, 38.8, 42.4, 45.4, 50.3, 57.2, 65.1, 71.9, 89.3 (d, J = 1.4 Hz), 90.2, 116.4 (d, J = 22.3 Hz), 116.6 (d, J = 3.5 Hz), 121.6, 135.4 (d, J = 8.9 Hz), 141.1, 164.1 (d, J = 253.6 Hz), 189.1. ¹⁹F NMR (CDCl₃): δ -106.9 (bs).

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₈H₃₃FO₂Na [M+Na]⁺443.2357, ευρεθέν 443.2339.

176-[3-(2-Μεθυλο-4-μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-36-όλη (5η)



Η ένωση **5η** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **4η** (200 mg, 0.29 mmol) και παραλαμβάνεται ως κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1).

Απόδοση: 48 mg (**37%**)

Σ.Τ.: 63-64°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -25.07° (*c* = 0.05583, CHCl₃)

IR: 3374, 2932, 2179, 1650 cm⁻¹

Rf: 0.11, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.73 (s, 3H, 19-CH₃), 0.84-0.90 (m, 1H), 0.99 (s, 3H, 18-CH₃), 1.03-2.41 (m, 18H), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.72 (t, *J* = 8.55 Hz, 1H, 17α-H), 3.49-3.55 (m, 1H, 3α-H), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 5.35 (d, *J* = 3.92 Hz, 1H, 6-H), 6.70-6.76 (m, 2H, αρωματικά), 7.47 (d, *J* = 8.44 Hz, 1H, αρωματικό).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.3, 20.9, 21.0, 22.6, 24.5, 31.5, 31.7, 31.8, 36.5, 37.2, 38.6, 42.1, 45.1, 50.0, 55.3, 56.8, 64.7, 71.6, 91.3, 92.8, 111.7, 112.0, 115.3, 121.3, 135.5, 140.7, 144.4, 161.4, 189.0.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₃₀H₃₉O₃ [M+H]⁺ 447.2894, ευρεθέν 447.2878, υπολογισθέν για C₃₀H₃₈O₃Na [M+Na]⁺ 469.2713, ευρεθέν 469.2694. 176-[3-(3-Αιθυλυνοφαινυλο)-1-οξο-2-προπυνυλο]-5-ανδροστεν-36-όλη (50)



Η ένωση **50** παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας από την ένωση **40** (99 mg, 0.14 mmol) και παραλαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό της με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1).

Απόδοση: 33 mg (**52%**)

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -41.67° (*c* = 0.13916, CHCl₃)

IR: 3299, 2933, 2194, 1658 cm⁻¹

Rf: 0.10, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.74 (s, 3H, 19-CH₃), 0.84-0.91 (m, 1H), 1.01 (s, 3H, 18-CH₃), 1.04-2.40 (m, 18H), 2.72 (t, *J* = 8.70 Hz, 1H, 17α-H), 3.13 (s, 1H, C=CH), 3.48-3.58 (m, 1H, 3α-H), 5.35 (d, *J* = 4.96 Hz, 1H, 6-H), 7.34 (t, *J* = 7.76 Hz, 1H, αρωματικό), 7.51-7.56 (m, 2H, αρωματικά), 7.66 (bs, 1H, αρωματικό).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.3, 19.3, 21.0, 22.3, 24.4, 31.5, 31.8, 31.9, 36.5, 37.2, 38.4,
42.2, 45.2, 50.0, 56.9, 64.9, 71.7, 78.5, 82.1, 89.3, 89.5, 120.7, 121.3, 122.9, 128.7,
132.9, 134.0, 136.0, 140.8, 188.8.

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₀H₃₅O₂ [M+H]⁺ 427.2632, ευρεθέν 427.2622.

176-Σπειρο[5-ανδροστεν-17,2'-οξιραν]-36-όλη (6)



Σε διάλυμα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (2 g, 3.93 mmol) σε άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (40 mL) προστίθενται διαδοχικά στους 0°C ιωδιούχο τριμεθυλοσουλφώνιο (2.1 g, 10.4 mmol) και *t*-βουτοξυκάλιο (1.17 g, 10.4 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί προσθήκη νερού και το μείγμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **6** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 8:2).

Απόδοση: 1.3 g (62%)

Σ.Τ.: 170-173°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -72.80° (c= 0.00125, CHCl₃)

Rf: 0.38, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.90 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.06-2.34 (m, 19H), 2.61 (d, *J* = 5.09 Hz, 1H, 20-H), 2.91 (d, *J* = 5.10 Hz, 1H, 20-H), 3.48-3.58 (m, 1H, 3α-H), 5.37 (d, *J*= 4.92 Hz, 1H, H-6).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.1, 19.4, 20.4, 23.6, 29.0, 31.3, 31.5, 32.0, 33.8, 36.6, 37.2, 39.9, 42.2, 50.1, 53.1, 53.6, 70.5, 71.6, 121.2, 140.9.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₀H₃₁O₂ [M+H]⁺ 303.2319, ευρεθέν 303.2320, υπολογισθέν για C₂₀H₃₀O₂Na [M+Na]⁺ 325.2138, ευρεθέν 325.2141, υπολογισθέν για C₄₀H₆₀O₄Na [2M+Na]⁺ 627.4384, ευρεθέν 627.4390.

17α-Αιθενυλο-5-ανδροστενο-36,176-διόλη (7)



Σε διάλυμα βινυλομαγνησιοβρωμιδίου (1.0Μ σε τετραϋδροφουράνιο, 45 mL, 45 mmol) προστίθεται στάγδην στους 0°C διάλυμα δεϋδροεπιανδροστερόνης (1.3 g, 4.5 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (13 mL) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί προσθήκη υπό ψύξη κορεσμένου υδατικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου και το μείγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **7** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3).

Απόδοση: 992 mg (69%)

Σ.Τ.: 180-183°C

Rf: 0.52, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 6:4

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.93 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.10-2.31 (m, 19H), 3.47-3.56 (m, 1H, 3α-H), 5.10 (dd, J = 0.90, 10.80 Hz, 1H, 21-H), 5.15 (dd, J = 0.90, 17.7 Hz, 1H, 21-H), 5.34 (d, J = 4.92 Hz, 1H, 6-H), 6.04 (dd, J = 10.80, 17.3 Hz, 1H, 20-H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.0, 19.4, 20.6, 23.6, 31.5, 31.6, 32.1, 32.6, 36.0, 36.5, 37.2, 42.2, 46.1, 49.9, 50.3, 71.6, 84.2, 111.9, 121.3, 140.8, 143.02.

17α-(2-Οξιρανυλο)-5-ανδροστενο-3*6*,17*6*-διόλη (8)



Σε διάλυμα της ένωσης **7** (992 mg, 3.13 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (33 mL) προστίθενται διαδοχικά στους -10°C σύμπλοκο ακετυλοακετόνης βαναδυλίου (36 mg, 0.137 mmol) και *t*-βουτυλοϋδροϋπεροξείδιο (~2.35 M σε 1,2διχλωροαιθάνιο - παρασκευάζεται με ήπια ανάδευση 38.8 mL 70% υδατικού διαλύματος *t*-βουτυλοϋδροϋπεροξειδίου με 65.9 mL 1,2-διχλωροαιθανίου - 4 mL, 9.39 mmol) και το μείγμα αναδεύεται θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα θειώδους νατρίου και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **8** λαμβάνεται ως μείγμα 2:1 των δύο διαστερεοϊσομερών (**8α** και **8β**) με τη μορφή λευκών κρυστάλλων μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: διχλωρομεθάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 6:1).

Απόδοση: 710 mg (68%)

Σ.Τ.: 165-168°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -53.10° (*c*= 0.00113, CHCl₃)

Rf: 0.24, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 6:4

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.88 (s, 0.99H, 18-CH₃, ένωση 8β), 0.93 (s, 1.99H, 18-CH₃, ένωση 8α), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 0.96-2.32 (m, 19H), 2.69 (dd, J = 4.2, 5.1 Hz, 0.33H, 21-H, ένωση 8β), 2.74-2.77 (m, 1H, 21-H), 2.87 (dd, J = 2.97, 4.80 Hz, 0.66H, 21-H, ένωση 8α), 3.09 (t, J = 4.27 Hz, 0.66H, 20-H, ένωση 8α), 3.21 (dd, J = 3.0, 3.90 Hz, 0.33H, 20-H, ένωση 8β), 3.45-3.55 (m, 1H, 3α-H), 5.34 (d, J = 5.13 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.9, 19.4, 20.5, 24.0, 31.6, 32.4, 36.0, 36.6, 37.3, 42.2, 43.2, 45.5, 50.1, 51.4, 51.8, 54.8, 56.2, 71.7, 79.7, 121.2, 140.8.

(3'S)-38-Υδροξυσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-οξιρανο]-3'-μεθανόλη (9)



Σε διάλυμα της ένωσης **8** (μείγμα των διαστερεοϊσομερών **8α** και **8β**) (710 mg, 2.13 mmol) σε άνυδρη μεθανόλη (35 mL) προστίθεται άνυδρο ανθρακικό κάλιο (737 mg, 5.33 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **9** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 85:15).

Απόδοση: 350 mg (48%)

Σ.Τ.: 195-197°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -70.00° (*c* = 0.0009, CHCl₃)

Rf: 0.35, διχλωρομεθάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 6:4

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 1.00 (s, 3H, 19-CH₃), 1.03-2.31 (m, 19H), 3.19 (dd, *J* = 4.1, 6.2 Hz, 1H, 20-H), 3.48-3.54 (m, 1H, 3α-H), 3.58 (dd, *J* = 6.3, 12.0 Hz, 1H, 21-H), 3.76 (dd, *J* = 4.0, 12.0 Hz, 1H, 21-H), 5.35 (d, *J* = 5.10 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.1, 19.4, 20.5, 23.8, 26.0, 31.4, 31.6, 31.9, 34.2, 36.5, 37.2, 40.9, 42.2, 50.1, 53.0, 60.2, 62.3, 71.7, 74.2, 121.2, 140.8.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₁H₃₃O₃ [M+H]⁺ 333.2424, ευρεθέν 333.2423, υπολογισθέν για C₂₁H₃₂O₃Na [M+Na]⁺ 355.2244, ευρεθέν 355.2243.

(Ε)-(36-Υδροξυ-5-ανδροστεν-17-υλιδενο)ακετονιτρίλιο (10)



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (90 mg, 2.24 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3.5 mL) προστίθεται στους 0°C διάλυμα κυανομεθανοφωσφονικού διαιθυλεστέρα (0.19 mL, 1.19 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο (1.75 mL) και το μείγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται στην ίδια θερμοκρασία στάγδην διάλυμα δεϋδροεπιανδροστερόνης (200 mg, 0.69 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.75 mL) και το μείγμα αναδεύεται με θέρμανση υπό επαναρροή. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί προσθήκη υπό ψύξη κορεσμένου υδατικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου και το μείγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 10 λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 8:2).

Απόδοση: 215 mg (100%)

Σ.Τ.: 164-167°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -60.10° (*c* = 0.0099, CHCl₃)

Rf: 0.32, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.85 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.03-2.33 (m, 17H), 2.58-2.79 (m, 2H), 3.49-3.56 (m, 1H, 3α-H), 5.00 (t, *J* = 2.46 Hz, 1H, 20-CH), 5.36 (d, *J* = 5.12 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 17.6, 19.2, 20.5, 23.7, 30.1, 31.27, 31.31, 31.4, 34.4, 36.4, 37.0,
 41.9, 45.8, 49.7, 54.0, 71.2, 87.7, 117.3, 120.7, 140.8, 180.8.

(Ε)-(36-Υδροξυ-5-ανδροστεν-17-υλιδενο)αιθανάλη (11)



Σε διάλυμα της ένωσης **10** (150 mg, 0.48 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (150 mL) προστίθεται στους -78°C διάλυμα διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδριδίου (1Μ σε διχλωρομεθάνιο, 1.44 mL, 1.44 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται επί 30 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία και στη συνέχεια, επί 3,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και κατόπιν, προστίθεται κορεσμένο διάλυμα τρυγικού καλιονατρίου. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **11** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Απόδοση: 151 mg (93%)

Σ.Τ.: 169-172°C

Rf: 0.22, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3

¹**H NMR (CDCl₃):** *δ* 0.88 (s, 3H, 18-CH₃), 1.04 (s, 3H, 19-CH₃), 1.09-2.39 (m, 17H), 2.77-3.00 (m, 2H), 3.47-3.57 (m, 1H, 3*α*-H), 5.37 (d, *J* = 5.10 Hz, 1H, 6-H), 5.76 (d, *J* = 8.15 Hz, 1H, 20-H), 9.87 (d, *J* = 7.94 Hz, 1H, 21-CHO).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 17.9, 19.4, 20.8, 24.3, 27.7, 29.6, 31.5, 31.6, 34.7, 36.6, 37.1,
42.2, 46.3, 50.1, 53.4, 71.6, 119.5, 121.1, 140.8, 180.0, 192.3.

(*E*)-Πρεγνανο-5,17(20)-διενο-3*6*,21-διόλη (12)



Σε μείγμα της ένωσης **11** (75 mg, 0.24 mmol) σε μεθανόλη (2.5 mL) προστίθενται διαδοχικά ένυδρο χλωριούχο δημήτριο (178 mg, 0.48 mmol) και νατριοβοροϋδρίδιο (20 mg, 0.48 mmol) και ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται υπό ψύξη κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου έως ότου το pH να είναι 7 και το μείγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **12** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ακετόνη 8:2).

Απόδοση: 70 mg (**92%**)

Σ.Τ.: 128-131°C

Rf: 0.16, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.78 (s, 3H, 18-CH₃), 1.03 (s, 3H, 19-CH₃), 1.08-2.44 (m, 19H), 3.47-3.58 (m, 1H, 3α-H), 4.05-4.19 (m, 2H, 21-CH₂OH), 5.23-5.27 (m, 1H, 20-H), 5.36 (d, *J* = 5.18 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 18.8, 19.7, 21.2, 24.6, 26.4, 29.9, 31.8, 31.9, 35.9, 36.8, 37.5, 42.5, 44.0, 50.7, 54.7, 60.7, 71.9, 115.7, 121.7, 141.1, 156.0.

(20*R*)-17α,20-εποξυ-5-πρεγνενο-3*β*,21-διόλη (13)



Σε μείγμα της ένωσης **12** (70 mg, 0.22 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (2.2 mL) προστίθενται στους 0°C άνυδρο ανθρακικό κάλιο (36 mg, 0.26 mmol) και 4χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ 55% (61 mg, 0.22 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται στους 0°C επί 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί διήθηση του στερεού υπολείμματος και το διήθημα εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **13** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ακετόνη/25% υδατική αμμωνία 5:3:0.1).

Απόδοση: 29 mg (40%)

Σ.Τ.: 138-141°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -77.58° (*c* = 0.0097, MeOH)

Rf: 0.34, διχλωρομεθάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 6:4

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.82 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 0.99-2.34 (m, 19H), 3.05 (dd, J = 3.6, 6.8 Hz, 1H, 21-H), 3.54-3.60 (m, 1H, 3α-H), 3.60 (m, 1H, 20-H), 3.85 (ddd, J = 3.5, 7.0, 11.5 Hz, 1H, 21-H), 5.37 (d, J = 5.1 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 15.9, 19.4, 20.5, 24.0, 27.5, 30.4, 31.5, 31.9, 34.3, 36.6, 37.2, 41.9, 42.2, 50.0, 52.5, 57.3, 62.7, 71.7, 73.9, 121.3, 140.8.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₁H₃₃O₃ [M+H]⁺ 333.2424, υπολογισθέν 333.2421, υπολογισθέν για C₂₁H₃₂O₃Na [M+Na]⁺ 355.2244, ευρεθέν 355.2241.

36-(t-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-όνη (14)



Σε διάλυμα δεϋδροεπιανδροστερόνης (1.0 g, 3.47 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10.4 mL) προστίθενται στους 0°C ιμιδαζόλιο (706 mg, 10.4 mmol) και ιώδιο (2.6 g, 10.4 mmol) και το μείγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη *t*βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοχλωριδίου (1.49 mL, 5.73 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 14 λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρα 9:1) και ανακρυστάλλωση από αιθανόλη.

Απόδοση: 1.7 g (**93%**)

Σ.Τ.: 117-120°C

Rf: 0.39, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.86 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.16-2.48 (m, 19H), 3.47-3.58 (m, 1H, 3α-H), 5.15 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, 6-H), 7.34-7.44 (m, 6H, αρωματικά), 7.66-7.73 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.3, 15.9, 19.3, 20.1, 20.3, 20.5, 27.3, 29.7, 31.6, 32.2, 34.2, 36.8, 38.8, 39.5, 42.2, 44.0, 58.6, 71.2, 121.2, 128.1, 129.9, 133.4, 135.8, 218.9.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₃₅H₄₆O₂Si (%): C= 79.79, H= 8.80. Ευρ.: C= 80.13, H= 8.42.

36-(t-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-17α-(2-προπενυλο)-5-ανδροστεν-176-όλη (15)



Σε διάλυμα της ένωσης **14** (500 mg, 0.95 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3.1 mL) προστίθεται στάγδην στους 0°C διάλυμα αλλυλομαγνησιοχλωριδίου (1.7M σε τετραϋδροφουράνιο, 5.5 mL, 9.5 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται υπό ψύξη κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και το μείγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **15** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ακετόνη 95:5).

Απόδοση: 510 mg (**93%**)

R_f: 0.31, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.78-0.85 (m, 2H), 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.10-1.31 (m, 3H), 1.40-1.72 (m, 10H), 1.89-1.95 (m, 2H), 2.10-2.17 (m, 2H), 2.25-2.35 (m, 2H), 3.50-3.55 (m, 1H, 3α-H), 5.12-5.18 (m, 3H, 6-H και 22-H), 5.93-6.00 (m, 1H, 21-H), 7.34-7.42 (m, 6H, αρωματικά), 7.67-7.72 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.2, 18.95, 19.06, 19.4, 20.6, 20.9, 23.8, 26.5, 26.9, 31.59, 31.64, 31.8, 32.7, 34.8, 36.5, 37.2, 41.7, 42.4, 45.9, 49.9, 50.9, 73.1, 82.4, 118.9, 120.8, 127.37, 127.39, 127.5, 127.6, 129.35, 129.37, 129.4, 134.69, 134.71, 134.75, 134.81, 135.3, 135.67, 135.68, 141.3.

238

3β-(*t*-Βουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-17α-(2-προπενυλο)-17β-(2-προπενυλοξυ)-5ανδροστένιο (16)



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε λάδι, 50 mg, 1.25 mmol, το οποίο έχει εκπλυθεί με άνυδρο πεντάνιο) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.5 mL) προστίθεται διάλυμα της ένωσης **15** (145 mg, 0.25 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (2 mL) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η αντίδραση αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη αλλυλοβρωμιδίου (0.1 mL, 1.15 mmol) και κατόπιν, το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε μείγμα παγόνερου με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **16** λαμβάνεται ως λάδι και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο.

Απόδοση: 150 mg (**96%**)

Rf: 0.83, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.79-0.91 (m, 2H), 0.94 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.09 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.14-1.32 (m, 3H), 1.40-1.73 (m, 10H), 1.87-1.94 (m, 2H), 2.10 (dd, *J* = 7.76, 15.1, 1H), 2.16 (ddd, *J* = 1.97, 4.66, 13.3, 1H), 2.36 (t, *J* = 12.1 Hz, 1H), 2.75 (dd, *J* = 4.80, 15.2 Hz, 1H), 3.53-3.58 (m, 1H, 3α-H), 3.95 (d, *J* = 5.30 Hz, 2H, 23-H), 5.10-5.14 (m, 4H, 6-H, 22-H και 25-H), 5.27 (dd, *J* = 1.72, 17.2 Hz, 1H, 25-H), 5.86-5.94 (m, 2H, 21-H και 24-H), 7.36-7.44 (m, 6H, αρωματικά), 7.69-7.74 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.9, 19.1, 19.3, 20.9, 23.5, 26.5, 26.8, 26.9, 31.6, 31.8, 32.4, 33.9, 34.3, 36.2, 36.5, 37.2, 42.4, 46.5, 49.8, 52.2, 64.2, 73.1, 87.4, 115.6, 117.2,

120.8, 127.39, 127.42, 127.6, 127.7, 129.3, 129.4, 129.5, 134.67, 134.71, 134.74, 134.9, 135.37, 135.44, 135.7, 141.1.

(17,2'*R*)-3*8*-(*t*-Bουτυλοδιφαινυλοσιλυλοξυ)-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυράνιο] (17)



Σε διάλυμα της ένωσης **16** (150 mg, 0.24 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (5 mL) προστίθεται μετά από απαέρωση καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (10 mg, 0.012 mmol) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **17** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/αιθέρας 95:5).

Απόδοση: 114 mg (79%)

Σ.Τ.: 142-144°C

Rf: 0.57, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.77-0.84 (m, 2H), 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 1.00 (s, 3H, 19-CH₃), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.11-1.32 (m, 3H), 1.39-1.72 (m, 10H), 1.81-1.94 (m, 3H), 2.12-2.15 (m, 1H), 2.31-2.35 (m, 2H), 3.49-3.55 (m, 1H, 3α-H), 4.14-4.22 (m, 2H, 23-H), 5.11 (d, J = 5.20 Hz, 1H, 6-H), 5.67-5.68 (m, 1H, 21-H), 5.73-5.75 (m, 1H, 22-H), 7.34-7.42 (m, 6H, αρωματικά), 7.66-7.68 (m, 4H, αρωματικά).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.6, 19.1, 19.4, 20.8, 23.3, 27.0, 31.2, 31.7, 31.8, 32.5, 33.0, 33.2, 36.5, 37.2, 42.4, 45.8, 50.0, 51.1, 63.3, 73.2, 83.1, 120.8, 123.4, 125.8, 127.42, 127.44, 129.40, 129.42, 134.75, 134.77, 135.75, 135.76, 141.3.

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₃₉H₅₃O₂Si [M+H]⁺ 581.3809, ευρεθέν 581.3797, υπολογισθέν για C₃₉H₅₁OSi [M-H₂O+H]⁺ 563.3704, ευρεθέν 563.3694.

(17,2'R)-3',6'-Διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν]-36-όλη (18)



Σε διάλυμα της ένωσης **17** (102 mg, 0.18 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (2 προστίθεται διάλυμα mL) φθοριούχου τετραβουτυλαμμώνιου (1.0M σε τετραϋδροφουράνιο, 1.3 mL, 1.3 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση εκπλένεται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 18 λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/αιθέρας 9:1).

Απόδοση: 52 mg (83%)

Σ.Τ.: 119-121°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -57.87° (c = 0.04666, CHCl₃)

Rf: 0.08, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 8:2

¹**H NMR (CDCl₃):** *δ* 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.05-2.00 (m, 18H), 2.20-2.23 (m, 1H), 2.28 (dd, *J* = 2.99, 12.7 Hz, 1H), 2.36 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H, 20-H), 3.47-3.52 (m, 1H, 3*α*-H), 4.14-4.21 (m, 2H, 23-H), 5.33 (d, 1H, *J* = 4.18 Hz, 6-H), 5.67-5.69 (m, 1H, 21-H), 5.74-5.75 (m, 1H, 22-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.6, 19.3, 20.8, 23.3, 31.2, 31.55, 31.68, 32.4, 32.9, 33.2, 36.5, 37.2, 42.2, 45.8, 50.0, 51.0, 63.2, 71.6, 83.0, 121.3, 123.3, 125.8, 140.8.

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₃H₃₅O₂ [M+H]⁺ 343.2632, ευρεθέν 343.2623, υπολογισθέν C₂₃H₃₃O [M-H₂O+H]⁺ 325.2526, ευρεθέν 325.2520.

36-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-όνη (19)



Σε διάλυμα δεϋδροεπιανδροστερόνης (5.0 g, 17.3 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (53 mL) προστίθενται στους 0°C ιμιδαζόλιο (3.5 g, 51.9 mmol) και ιώδιο (13.2 g, 51.9 mmol) και το μείγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη *t*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωριδίου (2.8 g, 19.0 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 2 ώρες. Μετα την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα θειοθεϊκού νατρίου και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **19** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/ οξικός αιθυλεστέρας 9:1).

Απόδοση: 6.8 g (97%)

Σ.Τ.: 147-149 °C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: 13.8° (c = 1.000, ακετόνη)

IR: 2928, 2890, 2858, 1748, 1463, 1376, 1254 cm⁻¹

Rf: 0.59, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 8:2

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.88 (s, 3H, 18-CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.96-1.01 (m, 1H), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.07 (dd, J = 3.71, 13.7 Hz, 1H), 1.26-1.30 (m, 2H), 1.44-2.30 (m, 14H), 2.45 (dd, J = 8.33, 19.3 Hz, 1H), 3.45-3.51 (m, 1H, 3α-H), 5.35 (d, J = 5.25 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.59, 13.5, 18.2, 19.5, 20.4, 21.8, 25.9, 30.8, 31.4, 31.5, 32.0, 35.8, 36.7, 37.3, 42.7, 47.6, 50.3, 51.8, 72.4, 120.3, 141.8, 221.1.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₂₅H₄₂O₂Si (%): C= 74.57, H= 10.51. Eup.: C= 74.53, H= 10.68.

36-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-αιθενυλο-5-ανδροστεν-176-όλη (20)



Σε διάλυμα βινυλομαγνησιοβρωμιδίου (1.0Μ σε τετραϋδροφουράνιο, 37 mL, 37 mmol) προστίθεται στάγδην στους 0°C διάλυμα της ένωσης **19** (1 g, 2.48 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10 mL) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μείγμα προστίθεται υπό ψύξη κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **20** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 9:1).

Απόδοση: 490 mg (46%)

Σ.Τ.: 139-141°C

Rf: 0.37, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 8:2

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.92 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.20-2.01 (m, 17H), 2.15-2.18 (m, 1H), 2.24-2.29 (m, 1H), 3.43-3.49 (m, 1H, 3α-H), 5.10 (dd, J = 1.16, 10.8 Hz, 1H, 21-H), 5.15 (dd, J = 1.14, 17.2 Hz, 2H, 21-H), 5.31 (d, J = 5.13 Hz, 1H, 6-H), 6.04 (dd, J = 10.80, 17.3 Hz, 1H, 20-H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.58, 13.9, 18.3, 19.5, 20.7, 23.7, 25.9, 31.7, 32.0, 32.2, 32.6, 36.2, 36.7, 37.4, 42.8, 46.1, 50.0, 50.3, 72.6, 84.2, 111.8, 120.8, 141.7, 143.0. 3β-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-αιθενυλο-17β-(2-προπενυλοξυ)-5ανδροστένιο (21)



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε λάδι, 132 mg, 3.3 mmol, το οποίο έχει εκπλυθεί με άνυδρο πεντάνιο) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (6 mL) προστίθεται διάλυμα της ένωσης **20** (140 mg, 0.33 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (2 mL) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η αντίδραση αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη αλλυλοβρωμιδίου (0.28 mL, 3.3 mmol) και κατόπιν, το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 3 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε μείγμα παγόνερου με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **21** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/διαιθυλαιθέρα 95:5).

Απόδοση: 150 mg (94%)

Σ.Τ.: 91-93°C

Rf: 0.53, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.94 (s, 3H, 18-CH₃),
1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.04-2.30 (m, 19H), 3.40-3.50 (m, 1H, 3α-H), 3.74 (dd, J = 4.61,
13.3 Hz, 1H, 22-H), 3.88 (dd, J = 4.62, 13.4 Hz, 1H, 22-H), 5.03-5.30 (m, 5H, 6-H, 21-H και 24-H), 5.83-5.95 (m, 2H, 20-H και 23-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.60, 14.2, 18.2, 19.4, 20.6, 23.6, 25.9, 29.9, 31.6, 32.0, 32.1, 32.2, 36.6, 37.3, 42.8, 46.6, 49.0, 50.1, 65.2, 72.5, 89.1, 114.6, 115.8, 120.8, 136.3, 141.5, 142.0.

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₇H₄₆OSi [M-H₂O+H]⁺ 414.3268, ευρεθέν 414.3251.

(17,2'*R*)-3*θ*-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)σπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'H)φουράνιο] (22)



Σε διάλυμα της ένωσης **21** (150 mg, 0.31 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (6.5 mL) προστίθεται μετά από απαέρωση καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (11 mg, 0.013 mmol) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **22** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και χρησιμοποιείται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/αιθέρας 97:3).

Απόδοση: 130 mg (**94%**)

Σ.Τ.: 163-165°C

Rf: 0.30, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.90 (s, 3H, 18-CH₃),
1.00 (s, 3H, 19-CH₃), 1.01-2.28 (m, 19H), 3.44-3.49 (m, 1H, 3α-H), 4.54 (m, 2H, 22-H),
5.30 (d, *J* = 5.12 Hz, 1H, 6-H), 5.79-5.80 (m, 2H, 20-H και 21-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.61, 14.0, 18.2, 19.4, 20.5, 23.4, 25.9, 31.6, 32.0, 32.4, 33.0, 35.6, 36.6, 37.3, 42.7, 45.5, 50.2, 51.6, 72.5, 74.4, 100.8, 120.8, 124.1, 132.4, 141.6.
HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₈H₄₅OSi [M-H₂O+H]⁺ 425.3234, ευρεθέν 425.3228.



διάλυμα της ένωσης **22** (110 mg, 0.24 mmol) σε άνυδρο Σε τετραϋδροφουράνιο (2.6 mL) προστίθεται διάλυμα φθοριούχου τετραβουτυλαμμώνιου (1.0M σε τετραϋδροφουράνιο, 1.2 mL, 1.2 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 23 λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/αιθέρας 65:35).

Απόδοση: 64 mg (**79%**)

Σ.Τ.: 196-198°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -98.84° (c = 0.02833, CHCl₃)

Rf: 0.06, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 8:2

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 1.00 (s, 3H, 19-CH₃), 1.03-2.32 (m, 19H), 3.443.55 (m, 1H, 3α-H), 4.49-4.59 (m, 2H, 22-H), 5.33 (d, J = 5.04 Hz, 1H, 6-H), 5.76-5.81 (m, 2H, 20-H και 21-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.0, 19.3, 20.6, 23.4, 31.4, 31.5, 32.4, 32.9, 35.5, 36.5, 37.2, 42.2, 45.4, 50.0, 51.5, 71.6, 74.4, 100.9, 121.3, 124.0, 132.3, 140.8.

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₂H₃₃O₂ [M+H]⁺ 329.2475, ευρεθέν 329.2464, υπολογισθέν για C₂₂H₃₁O [M-H₂O+H]⁺ 311.2369, ευρεθέν 311.2361.

(Ε)-[36-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-υλιδενο]ακετονιτρίλιο (24)



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε λάδι, 355 mg, 8.9 mmol, το οποίο έχει εκπλυθεί με άνυδρο εξάνιο) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (7 mL) προστίθεται στάγδην στους 0°C διάλυμα κυανομεθανοφωσφονικού διαιθυλεστέρα (0.76 mL, 4.8 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το μείγμα ψύχεται στους 0°C όπου ακολουθεί στάγδην προσθήκη διαλύματος της ένωσης **19** (800 mg, 1.98 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (7 mL) και η αντίδραση θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μείγμα προστίθεται υπό ψύξη κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και ακολουθεί εκχύλιση με χλωροφόρμιο. Η οργανική φάση εκπλένεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **24** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 9:1).

Απόδοση: 620 mg (**74%**)

Σ.Τ.: 125-127°C

Rf: 0.63, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 9:1

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.85 (s, 3H, 18-CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.04-2.32 (m, 17H), 2.52-2.79 (m, 2H), 3.43-3.53 (m, 1H, 3α-H), 5.01 (t, J = 2.34 Hz, 1H, 20-CH), 5.32 (d, J = 4.87 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.59, 17.7, 18.3, 19.4, 20.7, 23.8, 25.9, 30.3, 31.5, 31.6, 32.0, 34.6, 36.7, 37.3, 42.7, 46.0, 50.1, 54.1, 72.4, 87.9, 117.5, 120.5, 141.6, 180.9.

(Ε)-[36-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5-ανδροστεν-17-υλιδενο]αιθανάλη (25)



Σε διάλυμα της ένωσης **24** (620 mg, 1.45 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (45 mL) προστίθεται στους -78°C διάλυμα διϊσοβουτυλοαργιλιοϋδριδίου (1Μ σε διχλωρομεθάνιο, 4.4 mL, 4.4 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται επί 30 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία και στη συνέχεια, επί 3,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και κατόπιν, προστίθεται κορεσμένο διάλυμα τρυγικού καλιονατρίου. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **25** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Απόδοση: 580 mg (93%)

Σ.Τ.: 162-164°C

Rf: 0.24, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.94 (s, 3H, 18-CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.06 (s, 3H, 19-CH₃), 1.08-2.33 (m, 17H), 2.78-3.01 (m, 2H), 3.46-3.50 (m, 1H, 3α-H), 5.32 (d, *J* = 5.40 Hz, 1H, H-6), 6.78 (m, 1H, 20-H), 9.71 (d, *J* = 7.80 Hz, 1H, 21-CHO). ¹³CNMR (CDCl₃): δ -4.6, 15.8, 18.2, 19.4, 21.2, 25.9, 27.7, 30.3, 31.5, 31.6, 32.0, 34.6, 36.7, 37.3, 42.7, 46.0, 50.1, 54.1, 72.6, 120.4, 142.2, 152.9, 157.1, 189.9.

(E)- 36-(t-Bουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)πρεγνα-5,17(20)-διεν-21-όλη (26)



Σε διάλυμα της ένωσης **25** (480 mg, 1.12 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10 mL) προστίθεται στάγδην στους 0°C λιθιοαργιλιοϋδρίδιο (1Μ σε τετραϋδροφουράνιο, 0.58 mL, 0.58 mmol) και το μείγμα αναδεύεται στην ίδια θερμοκρασία επί 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα ψύχεται και προστίθεται στάγδην μείγμα τετραϋδροφουρανίου/νερού 1:1, ενώ ακολουθεί προσθήκη στερεού άνυδρου θειϊκού νατρίου. Το μείγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και διηθείται, ενώ το διήθημα εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **26** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Απόδοση: 450 mg (**92%**)

Σ.Τ.: 210-212°C

Rf: 0.15, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 7:3

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.78 (s, 3H, 18-CH₃), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.05-2.41 (m, 19H), 3.45-3.50 (m, 1H, H-3α), 4.09 (dd, J = 6.27, 12.1 Hz, 1H, 21-CH₂OH), 4.15 (dd, J = 7.45, 12.0 Hz, 1H, 21-CH₂OH), 5.25 (t, J = 6.83Hz 1H, 20-H), 5.32 (d, J = 5.13 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.60, 18.2, 18.5, 19.4, 21.2, 24.6, 25.9, 26.4, 29.9, 31.8, 31.9, 35.9, 36.9, 37.5, 42.5, 44.1, 50.7, 54.7, 60.4, 72.6, 115.6, 120.9, 141.7, 155.8.

(17*S*,20*S*)-3*θ*-(*t*-Boυτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17*α*,20-μεθανο-5-πρεγνεν-21-όλη (27)



Σε διάλυμα της ένωσης 26 (150 mg, 0.34 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (2.8 mL) προστίθεται διϊωδομεθάνιο (0.13 mL, 1.7 mmol) σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, η αντίδραση ψύχεται στους -78°C, προστίθεται διάλυμα διαιθυλοψευδαργύρου (1M σε εξάνιο, 1.7 mL, 1.7 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου 12 ώρες. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 5% υδατικού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος υπό ψύξη και το μείγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 27 λαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 9:1).

Απόδοση: 23 mg (**15%**)

Rf: 0.40, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.14 (t, J = 4.99 Hz, 1H, 20-CH), 0.55 (dd, J = 4.79, 9.80 Hz, 1H, 22-CH₂), 0.76 (s, 3H, 18-CH₃), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.00 (s, 3H, 19-CH₃), 1.03-1.81 (m, 17H), 2.00-2.05 (m, 1H), 2.16-2.19 (m, 1H), 2.24-2.28 (m, 1H), 3.33 (dd, J = 8.65, 11.0 Hz, 1H, 21-CH₂OH), 3.46-3.51 (m, 1H, 3α-H), 3.68 (dd, J = 6.27, 11.1 Hz, 1H, 21-CH₂OH), 5.32 (d, J = 5.06 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.58, 11.0, 17.0, 18.3, 19.4, 20.6, 21.9, 25.5, 25.9, 27.0, 31.99, 32.06, 32.5, 33.8, 35.9, 36.7, 37.4, 41.2, 42.8, 50.2, 55.2, 64.1, 72.5, 121.0, 141.5.

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₈H₄₇OSi [M-H₂O+H]⁺ 427.3391, ευρεθέν 427.3380.

(175,205)-17α,20-μεθανο-5-πρεγνενο-36,21-διόλη (28)



Σε διάλυμα της ένωσης **27** (23 mg, 0.052 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (0.5 προστίθεται διάλυμα φθοριούχου mL) τετραβουτυλαμμώνιου (1.0M σε τετραϋδροφουράνιο, 0.26 mL, 0.26 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 28 λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 6:4).

Απόδοση: 7.5 mg (**42%**)

Σ.Τ.: 195-197°C

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -96.00° (c = 0.05000, CHCl₃)

Rf: 0.11, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 7:3

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.14 (t, *J* = 5.01 Hz, 1H, 22-CH₂), 0.55 (dd, *J* = 4.80, 9.10 Hz, 1H, 22-CH₂), 0.78 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.05-1.87 (m, 17H), 2.02-2.06 (m, 1H), 2.21-2.26 (m, 1H), 2.31 (ddd, *J* = 2.07, 4.91, 12.9 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 8.55, 11.1 Hz, 1H, 21-CH₂OH), 3.50-3.55 (m, 1H, 3α-H), 3.69 (dd, *J* = 6.28, 11.2 Hz, 1H, 21-CH₂OH), 5.36 (d, *J* = 5.21 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 11.0, 16.9, 19.4, 20.5, 21.9, 25.6, 27.0, 31.6, 31.9, 32.5, 33.8, 35.9, 36.6, 37.3, 41.2, 42.2, 50.1, 55.2, 64.1, 71.7, 121.6, 140.7.

HR-MS (APCI+): υπολογισθέν για C₂₂H₃₃O [M-H₂O+H]⁺ 313.2526, ευρεθέν 313.2517, υπολογισθέν για C₂₂H₃₁ [M-2H₂O+H]⁺ 295.2420, ευρεθέν 295.2409.

36-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-(2-προπενυλο)-5-ανδροστεν-176-όλη (29)



Σε διάλυμα της ένωσης 19 (500 mg, 1.24 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο προστίθεται (3 mL) στάγδην στους 0°C διάλυμα αλλυλομαγνησιοχλωριδίου (1.7Μ σε τετραϋδροφουράνιο, 5.5 mL, 9.5 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μείγμα προστίθεται υπό ψύξη κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και κατόπιν, ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν 29 λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5).

Απόδοση: 510 mg (92%)

Σ.Τ.: 110-112°C

IR: 3260, 1638 cm⁻¹

Rf: 0.40, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 8:2

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.89 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.03-2.32 (m, 21H), 3.45-3.50 (m, 1H, 3α-H), 5.14-5.20 (m, 2H, 22-H), 5.31 (d, *J* = 5.14 Hz, 1H, 6-H), 5.95-6.02 (m, 1H, 21-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.57, 14.3, 18.2, 19.4, 20.7, 23.9, 25.9, 31.7, 31.8, 32.1, 32.8, 35.0, 36.7, 37.4, 41.7, 42.8, 46.0, 50.2, 51.0, 72.6, 82.5, 119.1, 120.8, 134.9, 141.7.
3β-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-(2-προπενυλο)-17β-(2-προπυνυλοξυ)ανδροστ-5-ένιο (30)



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε λάδι, 608 mg, 15.2 mmol, το οποίο έχει εκπλυθεί με άνυδρο εξάνιο) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (26 mL) προστίθεται διάλυμα της ένωσης **29** (680 mg, 1.52 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (12 mL) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η αντίδραση αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη προπαργυλοβρωμιδίου (1.35 mL, 15.2 mmol) και κατόπιν, το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 72 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε μείγμα παγόνερου με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **30** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 9:1).

Απόδοση: 460 mg (**62%**)

Σ.Τ.: 95-97°C

Rf: 0.37, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.96 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.15-2.28 (m, 20H), 2.37 (t, J = 2.32 Hz, 1H, 25-H), 2.69 (dd, J = 4.83, 15.3 Hz, 1H), 3.44-3.49 (m, 1H, 3α-H), 4.09-4.14 (m, 2H, 23-H), 5.11-5.15 (m, 2H, 22-H), 5.30 (d, J = 5.09 Hz, 1H, 6-H), 5.90-5.97 (m, 1H, 21-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.58, 14.0, 18.2, 19.4, 20.9, 23.5, 25.9, 31.7, 32.0, 32.5, 33.7, 34.2, 36.3, 36.6, 37.4, 42.7, 46.6, 49.9, 51.8, 52.2, 72.5, 73.1, 80.8, 88.7, 117.6, 120.7, 134.5, 141.5.

(17,2'*R*)-3*6*-(*t*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-5΄-αιθενυλο-3',6'-διϋδροσπειρο[5ανδροστενο-17,2'-πυράνιο] (31)



Σε διάλυμα της ένωσης **30** (300 mg, 0.62 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (30 mL) προστίθεται μετά από απαέρωση καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (26 mg, 0.031 mmol) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **31** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και χρησιμοποιείται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 99:1).

Απόδοση: 40 mg (**27%**)

Σ.Τ.: 89-91°C

Rf: 0.43, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.92 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.06-2.50 (m, 21H), 3.42-3.52 (m, 1H, 3α-H), 4.28-4.42 (m, 2H, 23-H), 4.85-4.93 (m, 2H, 25-H), 5.31 (d, J = 5.19 Hz, 1H, 6-H), 5.79 (bs, 1H, 21-H), 6.25 (dd, J = 11.1, 17.9 Hz, 1H, 24-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.57, 13.5, 18.2, 19.4, 20.9, 23.3, 25.9, 31.76, 31.84, 32.0, 32.6, 33.2, 33.6, 36.7, 37.4, 42.8, 45.7, 50.1, 51.4, 62.7, 72.5, 83.4, 110.3, 120.8, 125.4, 134.3, 135.8, 141.6.

(17,2'R)-5'-αιθενυλο-3',6'-διϋδροσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'-πυραν]-38-όλη (32)



Σε διάλυμα της ένωσης **31** (40 mg, 0.082 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.5 mL) προστίθεται διάλυμα φθοριούχου τετραβουτυλαμμώνιου (1.0M σε τετραϋδροφουράνιο, 0.45 mL, 0.45 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωη της αντίδρασης, το μείγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **32** λαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 8:2).

Απόδοση: 30 mg (**99%**)

 $[\alpha]_{D}^{20}$: -45.00° (c = 0.04000, CHCl₃)

Rf: 0.06, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 8:2

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.93 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.06-2.04 (m, 18H), 2.21-2.25 (m, 1H), 2.29 (ddd, *J* = 1.96, 4.85, 12.9 Hz, 1H), 2.46 (d, 1H, *J* = 17.1 Hz, 20-H), 3.48-3.54 (m, 1H, 3α-H), 4.29-4.39 (m, 2H, 23-H), 4.87-4.92 (m, 2H, 25-H), 5.34 (d, *J* = 5.15 Hz, 1H, 6-H), 5.78 (bs, 1H, 21-H), 6.24 (dd, *J* = 11.1, 17.9 Hz, 1H, 24-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.5, 19.4, 20.8, 23.3, 31.6, 31.7, 31.8, 32.5, 33.1, 33.6, 36.5, 37.2, 42.3, 45.7, 50.0, 51.3, 62.7, 71.7, 83.4, 110.3, 121.3, 125.4, 134.3, 135.8, 140.8.
 HR-MS (APCl+): υπολογισθέν για C₂₅H₃₇O₂ [M+H]⁺ 369.2788, ευρεθέν 369.2794.

3β-(t-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-17α-αιθενυλο-17β-(2-προπυνυλοξυ)-ανδροστ-5ένιο (33)



Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60% σε λάδι, 368 mg, 9.2 mmol, το οποίο έχει εκπλυθεί με άνυδρο εξάνιο) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (16 mL) προστίθεται διάλυμα της ένωσης **20** (400 mg, 0.92 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (7 mL) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 30 λεπτά. Στη συνέχεια, η αντίδραση αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη προπαργυλοβρωμιδίου (0.82 mL, 9.2 mmol) και κατόπιν, το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε μείγμα παγόνερου με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου και εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **33** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 9:1).

Απόδοση: 380 mg (**88%**)

Σ.Τ.: 133-135°C

Rf: 0.66, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.03 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.87 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.92 (s, 3H, 18-CH₃), 0.99 (s, 3H, 19-CH₃), 1.03-2.28 (m, 19H), 2.34 (t, J = 2.33 Hz, 1H, 24-H), 3.39-3.49 (m, 1H, 3α-H), 3.90 (dd, J = 2.36, 15.4 Hz, 1H, 22-H), 4.02 (dd, J = 2.39, 15.4 Hz, 1H, 22-H), 5.09 (d, J = 10.9, 17.4 Hz, 1H, 21-H), 5.27-5.32 (m, 2H, 6-H και 21-H), 5.87 (dd, J = 10.9, 17.6 Hz, 1H, 20-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.60, 14.1, 18.2, 19.4, 20.5, 23.5, 25.9, 29.5, 31.6, 31.9, 32.0, 32.2, 36.6, 37.3, 42.8, 46.5, 49.0, 50.1, 52.7, 72.5, 72.8, 81.7, 90.3, 116.7, 120.7, 140.9, 141.5.

(17,2'*R*)-3*6*-(*t*-Bουτυλοδιμεθυλοσιλυλοξυ)-4'-αιθενυλοσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'H)-φουράνιο] (34)



Σε διάλυμα της ένωσης **33** (300 mg, 0.64 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (25 mL) προστίθεται μετά από απαέρωση καταλύτης Grubbs δεύτερης γενιάς (27 mg, 0.032 mmol) και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **34** λαμβάνεται ως λάδι και χρησιμοποιείται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5).

Απόδοση: 30 mg (**10%**)

Rf: 0.50, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 95:5

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.06 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.91 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.05-2.31 (m, 19H), 3.42-3.52 (m, 1H, 3α-H), 4.63-4.72 (m, 2H, 22-H), 4.95 (d, J = 17.4 Hz, 1H, 24-H), 5.12 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 24-H), 5.31 (d, J = 5.02Hz, 1H, 6-H), 5.79 (bs, 1H, 20-H), 6.50 (dd, J = 10.8, 17.7 Hz, 1H, 23-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ -4.57, 14.1, 18.2, 19.5, 20.6, 23.4, 25.9, 31.6, 32.0, 32.5, 33.2, 35.4, 36.6, 37.4, 42.8, 46.1, 50.3, 51.8, 72.6, 73.0, 101.4, 115.5, 120.8, 129.8, 131.6, 136.6, 141.7.

(17,2'R)-4'-Αιθενυλοσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(5'H)-φουραν]-36-όλη (35)



Σε διάλυμα της ένωσης **34** (30 mg, 0.064 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.5 mL) προστίθεται διάλυμα φθοριούχου τετραβουτυλαμμώνιου (1.0M σε τετραϋδροφουράνιο, 0.5 mL, 0.5 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **35** λαμβάνεται ως λάδι μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 75:25).

Απόδοση: 23 mg (ποσοτικά)

Rf: 0.07, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/διαιθυλαιθέρας 8:2

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.91 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.04-2.33 (m, 19H), 3.46-3.55 (m, 1H, 3α-H), 4.62-4.71 (m, 2H, 22-H), 4.96 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H, 24-H), 5.12 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, 24-H), 5.35 (d, *J* = 5.04 Hz, 1H, 6-H), 5.76-5.82 (m, 1H, 20-H), 6.49 (dd, *J* = 10.8, 17.7 Hz, 1H, 23-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.1, 19.4, 20.6, 23.4, 31.5, 31.6, 32.4, 33.1, 35.4, 36.6, 37.2, 42.2, 46.1, 50.1, 51.7, 71.7, 73.0, 101.4, 115.5, 121.3, 129.8, 131.6, 136.6, 140.9.

36-Ακετοξυ-5-ανδροστεν-17-όνη (36)



Σε διάλυμα της δεϋδροεπιανδροστερόνης (2.5 g, 8.67 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (8 mL) προστίθεται στους 0°C οξικός ανυδρίτης (7.4 mL, 78.0 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μείγμα προστίθεται υπό ψύξη νερό και στη συνέχεια, ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Για την πλήρη απομάκρυνση της περίσσειας πυριδίνης, πραγματοποιείται συναπόσταξη της πυριδίνης με νερό (x3). Το προϊόν **36** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο.

Απόδοση: 2.83 g (99%)

Σ.Τ.: 169-171°C

IR: 1740, 1725 cm⁻¹

Rf: 0.28, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 8:2

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.88 (s, 3H, 18-CH₃), 1.04 (s, 3H, 19-CH₃), 1.11-2.00 (m, 15H), 2.03 (s, 3H, CH₃CO), 2.09-2.35 (m, 3H), 2.46 (m, 1H), 4.55-4.64 (m, 1H, 3α-H), 5.41 (d, *J* = 4.15 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.5, 19.3, 20.2, 21.3, 21.8, 27.6, 30.7, 31.3, 31.4, 35.7, 36.6, 36.8, 38.0, 47.4, 50.0, 51.6, 73.6, 121.8, 139.8, 170.4, 220.9.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₂₁H₃₀O₃ (%): C= 76.33, H= 9.15. Eup.: C= 76.22, H= 9.06.

36-Ακετοξυσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(1',3')-διοξολάνιο] (37)



Σε διάλυμα της ένωσης **36** (1.32 g, 4.0 mmol) σε διαιθοξυμεθοξυαιθάνιο (5 mL) προστίθενται διαδοχικά αιθυλενογλυκόλη (5.8 mL, 105 mmol) και 4τολουολοσουφονικό οξύ (43 mg, 0.22 mmol). Στη φιάλη προσαρμόζεται συσκευή Dean-Stark και το μείγμα θερμαίνεται υπό επαναρροή επί 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μείγμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **37** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 95:5).

Απόδοση: 1.22 g (**82%**)

Σ.Τ.: 139-141°C

IR: 1732 cm⁻¹

Rf: 0.38, κυκλοεξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 8:2

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.86 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 1.08-2.00 (m, 16H), 2.03 (s, 3H, CH₃CO), 2.31-2.33 (m, 2H), 2.46 (m, 1H), 3.87-3.94 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 4.55-4.66 (m, 1H, 3α-H), 5.38 (d, *J* = 4.67 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.2, 19.3, 20.4, 21.4, 22.7, 27.7, 30.5, 31.2, 32.0, 35.1, 36.5, 36.9, 38.0, 45.6, 49.8, 50.5, 64.5, 65.1, 73.8, 119.4, 122.4, 139.5, 170.5.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₂₃H₃₅O₄ (%): C= 73.76, H= 9.15. Eup.: C= 73.72, H= 9.53.



Σε διάλυμα της ένωσης **37** (740 mg, 1.98 mmol) σε μείγμα ακετόνης (39 mL) και πυριδίνης (1 mL) προστίθενται διαδοχικά *N*-υδροξυ-φθαλιμίδιο (718 mg, 4.4 mmol) και διένυδρο διχρωμικό νάτριο (894 mg, 3.0 mmol). Το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται δύο φορές επιπλέον ποσότητα διένυδρου διχρωμικού νατρίου (298 mg, 1.0 mmol) μετά από 10 και 20 ώρες συνεχούς ανάδευσης. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μετά από 48 ώρες, οπότε το μείγμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο και διηθείται από κελλίτη. Το διήθημα εκπλένεται διαδοχικά με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου και νερό, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **38** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (σύστημα έκλουσης: εξάνιο/ακετόνη/25% υδατική αμμωνία 85:15:0.1).

Απόδοση: 600 mg (**78%**)

Σ.Τ.: 175-177°C

IR: 2950, 2880, 1810, 1732, 1668, 1615, 1242, 1037 cm⁻¹

Rf: 0.27, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 8:2

¹**H NMR (CDCl₃):** δ 0.87 (s, 3H, 18-CH₃), 1.21 (s, 3H, 19-CH₃), 1.26-2.01 (m, 13H), 2.05 (s, 3H, CH₃CO), 2.24 (t, J = 11.3 Hz, 1H), 2.41-2.59 (m, 3H), 3.82-3.97 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 4.66-4.77 (m, 1H, 3α-H), 5.70 (d, J = 1.58 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 14.4, 17.3, 20.6, 21.3, 25.0, 27.3, 29.6, 34.1, 36.0, 37.8, 38.3, 44.4, 45.3, 46.1, 49.7, 64.4, 65.2, 72.1, 118.6, 126.6, 164.2, 170.3, 201.3.

Στοιχειακή ανάλυση: Υπολ. για C₂₃H₃₂O₅ (%): C= 71.11, H= 8.33. Eup.: C= 70.87, H= 8.52.

7(*Z*)-(*Ο*-Καρβοξυμεθυλ)οξίμη της 3*8*-ακετοξυσπειρο[5-ανδροστενο-17,2'(1',3')διοξολαν]-7-όνης (39)



Σε διάλυμα της ένωσης **38** (1.47 g, 3.78 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (28 mL) προστίθεται υδροχλωρικό αλάτι της *O*-(καρβοξυμεθυλο)υδροξυλαμίνης (1.65 g, 7.56 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, ενώ για την πλήρη απομάκρυνση της περίσσειας πυριδίνης, πραγματοποιείται συναπόσταξη της πυριδίνης με τολουόλιο (x3). Στη συνέχεια, το υπόλειμμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **39** λαμβάνεται ως λευκό αφρώδες στερεό και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο.

Απόδοση: 1.74 g (ποσοτικά)

Σ.Τ.: 93-95°C

Rf: 0.19, πετρελαϊκός αιθέρας 40-60°C/οξικός αιθυλεστέρας 6:4

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.88 (s, 3H, 18-CH₃), 1.14 (s, 3H, 19-CH₃), 1.19-1.86 (m, 13H), 2.04 (s, 3H, CH₃CO), 2.24-2.58 (m, 4H), 3.85-3.94 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 4.59 (d, J = 2.08 Hz, 2H, OCH₂COOH), 4.65-4.71 (m, 1H, 3α-H), 6.51 (m, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 13.9, 17.9, 20.1, 21.3, 24.9, 27.4, 30.6, 35.5, 36.1, 37.1, 38.1, 38.5, 46.0, 47.9, 49.7, 63.6, 70.1, 72.5, 77.2, 113.7, 154.5, 157.9, 170.3, 172.8.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₅H₃₆NO₇ [M+H]⁺ 462.2486, ευρεθέν 462.2476, υπολογισθέν για C₂₅H₃₅NO₇Na [M+Na]⁺ 484.2306, ευρεθέν 484.2294.

7(Ζ)-(Ο-Καρβοξυμεθυλ)οξίμη της 3β-ακετοξυ-ανδροστ-5-εν-7,17-διόνης (40)



Σε διάλυμα της ένωσης **39** (1.75 g, 3.78 mmol) σε μείγμα ακετόνης/νερού 5:1 (77:15.5 mL, αντίστοιχα) προστίθεται ένυδρο 4-τολουολοσουλφονικό οξύ (284 mg, 1.50 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, οι διαλύτες εξατμίζονται υπό κενό και το υπόλειμμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν **40** λαμβάνεται ως λευκό αφρώδες στερεό και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο.

Απόδοση: 1.61 g (ποσοτικά)

Σ.Τ.: 189-191°C

Rf: 0.45, διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 9:1

¹**H NMR (CDCl₃):** *δ* 0.90 (s, 3H, 18-CH₃), 1.15 (s, 3H, 19-CH₃), 1.20-1.95 (m, 12H), 2.05 (s, 3H, CH₃CO), 2.09-2.68 (m, 5H), 4.63 (d, *J* = 4.18 Hz, 2H, OCH₂COOH), 4.65-4.71 (m, 1H, 3*α*-H), 6.56 (d, *J* = 1.39 Hz, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 12.9, 17.0, 19.4, 24.2, 29.9, 30.0, 34.7, 35.9, 36.4, 37.8, 41.1, 45.6, 47.4, 49.4, 69.5, 69.6, 112.4, 154.2, 156.3, 172.1, 222.0.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₃H₃₂NO₆ [M+H]⁺ 418.2224, ευρεθέν 418.2205, υπολογισθέν για C₂₃H₃₁NO₆Na [M+Na]⁺ 440.2044, ευρεθέν 440.2022.

7(Ζ)-(Ο-Καρβοξυμεθυλ)οξίμη της 3β-υδροξυ-ανδροστ-5-εν-7,17-διόνης (41)



Σε διάλυμα της ένωσης **40** (1.61 g, 3.85 mmol) σε μεθανόλη (58 mL) προστίθεται 1N υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του λιθίου (23 mL, 23 mmol) και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 3,5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, οι διαλύτες εξατμίζονται υπό κενό και το υπόλειμμα αραιώνεται με νερό. Το διάλυμα οξινίζεται με 10% υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, οπότε το προϊόν καταβυθίζεται και διηθείται. Το προϊόν **41** λαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό και χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στο επόμενο στάδιο.

Απόδοση: 1.45 g (ποσοτικά)

Σ.Τ.: 217-218°C

[α]²⁰_D: -37.90° (c = 1.00000, αιθανόλη)

IR: 3460, 2940, 1760, 1740, 1640, 1090 cm⁻¹

R_f: 0.23, διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 9:1

¹H NMR (CD₃OD/CDCl₃): δ 0.90 (s, 3H, 18-CH₃), 1.14 (s, 3H, 19-CH₃), 1.18-2.75 (m, 17H), 3.49-3.54 (m, 1H, 3α-H), 4.54 (bs, 2H, OCH₂COOH), 6.54 (bs, 1H, 6-H).

¹³C NMR (CD₃OD/CDCl₃): δ 12.9, 17.0, 19.4, 24.2, 29.9, 30.0, 34.7, 35.9, 36.4, 37.8, 41.1, 45.6, 47.4, 49.4, 69.5, 69.6, 112.4, 154.2, 156.3, 172.1, 222.0.

HR-MS (ESI+): υπολογισθέν για C₂₁H₃₀NO₅ [M+H]⁺ 376.2118, ευρεθέν 376.2114.

Πρόσδεση της 7(*Z*)-(*Ο*-καρβοξυμεθυλ)οξίμης της 3*B*-υδροξυ-ανδροστ-5-εν-7,17διόνης στη NovaPEG αμινο-ρητίνη



Σε διάλυμα της ένωσης 41 (500 mg, 1.33 mmol) σε άνυδρο προστίθενται διμεθυλοφορμαμίδιο (7 mL) διαδοχικά ένυδρο 1υδροξυβενζοτριαζόλιο (180 mg, 1.33 mmol) και N,N'-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (0.21 mL , 1.33 mmol) και το μείγμα αναδεύεται επί 1 ώρα. Στη συνέχεια, το μείγμα προστίθεται στη NovaPEG αμινο-ρητίνη (341 mg, 0.26 mmol, 0.78 mmol/gr), που έχει διογκωθεί προηγουμένως με διμεθυλοφορμαμίδιο επί 1 ώρα, και ακολουθεί ανάδευση επί 48 ώρες. Όταν η αντίδραση ολοκληρώνεται, η ρητίνη εκπλένεται διαδοχικά με διχλωρομεθάνιο (x2), μεθανόλη (x2) και διαιθυλαιθέρα (x2) και ξηραίνεται μέχρι ξηρού υπό κενό.

Απόδοση: 349.8 mg (57%, 0.35 mmol/gr)

¹³C NMR (gel phase, CDCl₃): δ 14.0, 18.1, 20.2, 24.9, 30.7, 31.2, 35.5, 36.5, 37.0, 38.4, 42.2, 47.8, 49.9, 66.6, 72.6, 113.1, 154.2, 157.1, 170.2, 220.6.
IR: 2867, 1736, 1669, 1653, 1637, 1456, 1348, 1289, 1247, 1097, 946 cm⁻¹

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Bcl-2	Πρωτεΐνη του λεμφώματος-2 των Β κυττάρων				
¹³ C NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός ισοτόπου άνθρακα 13				
CDCl ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο				
CD₃OD	Δευτεριωμένη μεθανόλη				
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ				
¹ H NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός πρωτονίου				
HSD	Υδροξυστεροειδο-αφυδρογονάση				
GAD	Αποκαρβοξυλάση γλουταμικού οξέος				
IC ₅₀	Συγκέντρωση ουσίας η οποία προκαλέι το ήμισυ του μέγιστου				
	βιολογικού αποτελέσματος				
K _d	Σταθερά διάστασης				
mRNA	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ				
NOE	Πυρηνικό φαινόμενο Overhauser				
PBG	Φαινυλοδιγουανίδιο				
SSRI	Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης				
THIP	4,5,6,7-τετραϋδροϊσοξαζολο[5,4-c]πυριδιν-3-όλη				

<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</u>



<u>Φάσματα ¹Η και ¹³C NMR της ένωσης **5στ**</u>



<u>Φάσματα ¹Η και ¹³C NMR της ένωσης **5η**</u>



<u>Φάσματα ¹Η και ¹³C NMR της ένωσης **5θ**</u>



<u>Φάσματα ¹Η και ¹³C NMR της ένωσης **23**</u>



<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ</u>

<u>Χρωματογραφήματα HPLC</u>







Όργανο: Spectra System, Στήλη: RP-Nucleosil 100-5 C18 Poή: 1 mL/min, UV: 254 nm Μέθοδος: 0-5 min ACN/H2O 80%-20%, 5-10 min ACN 100%

























ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

	¹ H	¹³ C	HMBC	COSY	NOESY
40.04	0.07()		$(O_H \rightarrow O_C)$		
18-Me	0.87 (S)	14.1	C-17,14,13,12	_	
	0.00 (m)	FO 1	C 1 10	11 0 11	8,150,16,110
9	0.96 (m)	50.1	C-1,19	H-8,11	$H-7\alpha, 14, 12\alpha$
19-IVIE	1.0 (S)	19.4	C-5,9,1,10	—	н- 1 <i>6,46,</i> 8,11 <i>6</i>
1	1α: 1.06 (m)	37.2	C-5,3,19	H-2	Η-3α,2α
	1 <i>6</i> : 1.84 (m)				H ₃ -19
	12 <i>6</i> : 1.12 (m)				H-20
12	12α: 1.44(m)	34.2	C-14,13,11,18	H-11	H-9,20
14	1.16 (m)	53	C-7,8,18	H-8,15	Η-7α,9
	15 <i>β</i> : 1.42 (m)				H ₃ -18
15	15α: 1.7 (m)	23.8	C-13,16	H-14,16	Η-7α,14
	11 <i>β</i> : 1.43 (m)				H ₃ -18,19
11	11α: 1.59(m)	20.5	C-9,13,8,12	H-9,12	—
2	2 <i>6</i> : 1.49 (m)	31.6	C-3	H-1,3	H-4 <i>6</i>
	2α: 1.83 (m)				Η-3α,1α
8	1.57 (m)	31.9	C-7	H-7,9,14	H ₃ -18,19
16	1.8 (m)	26	C-	H-15	H₃-18,H-
			17,20,14,13,15		21α,21β
	7α: 2.04 (dd, 5.3				Η-9,6,14,15α
7	και 2.7 Hz)	31.4	C-5,6,9	H-8,6	
	7 <i>6</i> : 1.56 (m)				H-6
	4 <i>β</i> : 2.23 (m)				H₃-19,H-2 <i>6</i>
4	4α: 2.3 (ddd,	42.2	C-5,6,3,10,2	Η-3α,6	H-6
	13.0, 4.6 και 1.7				
	Hz)				
20 <i>R</i>	3.19 (dd, 6.2 και	60.2	C-21	H-21	Η-12α,12β
	4.1 Hz)				
3	3.52 (m)	71.7	—	H-2,4	Η-1α,2α
	3.58 (dd, 12.0				Η-16α,16β
	και 6.3 Hz)				
21	3.76 (dd, 12.0	62.3	C-17,20	H-20	Η-16α,16β
	και 4.0 Hz)				
6	5.35 (d, 5.1 Hz)	121.2	C-4,10,8	H-7,4	Η-4α,7α,7β
10	—	36.6	—	—	—
13	—	40.9		—	—
17	—	74.2	—	_	—
5	I —	140.8	—	—	-

Συγκεντρωτικός πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις (¹Η και ¹³C), συσχετίσεις ΗΜΒC και αλληλεπιδράσεις COSY και NOESY για την ένωση **9**.

	¹ H	¹³ C	HMBC (δ _H →δ _c)	COSY	NOESY
18-Me	0.82 (s)	15.9	C-	—	H-
			17,14,13,10,12,11		128,158,118,8,168,20
9	0.99 (m)	50.0	C-19,11,10,1	H-8,11	Η-12α
19-Me	1.02 (s)	19.4	C-9,2,10,5,8	—	Н-1 <i>6,46,</i> 11 <i>6,</i> 8
1	1α: 1.1 (dt,				Η-3α
	14.5 και 5.0	37.2	C-5,3,9	H-2	
	Hz)				
	1 <i>6</i> : 1.84 (m)				H ₃ -19
	12 <i>6</i> : 1.21 (m)	30.4	C-14,13,18	H-11	H ₃ -18,H-11α
12	12α: 1.29(m)				H-9
15	15 <i>6</i> : 1.27 (m)	24.0	C-17,14,13,16	H-14,16	H ₃ -18
	15α: 1.85 (m)				Η-7α
14	1.35 (m)	52.6	C-9,18	H-15,8	Η-16α
	11 <i>6</i> : 1.42 (m)	20.1	C-13	H-9,12	H ₃ -18,19
11	11α: 1.59 (m)				H-126
2	2 <i>6</i> : 1.49 (m)	31.5	C-3,4	Η-3α	H-4 <i>6</i>
	2α: 1.83 (m)				Η-3α
8	1.5 (m)	31.9	C-15	H-9,7,14	H ₃ -18,19
16	16α: 1.58 (m)	27.5	C-17,14,13,15	H-15	H-14
	16 <i>6</i> : 2.18 (m)				H₃-18
	7 <i>6</i> : 1.63 (m)	31.5	C-5,6,9,8	H-6,8	_
7	7 <i>6</i> : 2.05 (m)				Η-15α
	4 <i>β</i> : 2.24 (m)				H-2 <i>в,</i> H₃-19,
4	4α: 2.3 (ddd,	42.2	C-5,6,3,2	H-3α,6	H-6
	13.0, 5.0 και				
	2.0 Hz)				
205	3.05 (dd, 6.8	57.3	C-21	H-21	H ₃ -18,H-12β,12α
	και 3.6 Hz)				
3	3.54 (m)	71.7	—	H-1,2	Η-1α,2α
	3.61 (m)				
	3.85 (ddd,	62.7	C-17	H-20	Η-20,16α,16β
21	11.5, 7.0 και				
	3.5 Hz)				
6	5.37 (d, 5.10	121.3	C-4,8,10	H-7	Η-4α,7α,7β
	Hz)				
10	—	36.6	—	—	—
13	—	41.9	—	—	_
17	—	73.9	—	—	—
5	—	140.8	—	—	—

Συγκεντρωτικός πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις (¹Η και ¹³C), συσχετίσεις ΗΜΒC και αλληλεπιδράσεις COSY και NOESY για την ένωση **13**.

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

(1) ΜcMurry, J.: *Οργανική Χημεία*; Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001; Vol. II.

(2) Belelli, D.; Lambert, J. J.: Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nature Reviews Neuroscience* **2005**, *6*, 565-575.

(3) Selye, H.: Anesthetic effect of steroid hormones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1941**, *46*, 116-121.

(4) Selye, H.: The antagonism between anesthetic steroid hormones and pentamethyltetrazol. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **1942**, *27*, 1051-1053.

(5) Harrison, N. L.; Simmonds, M. A.: Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Research* **1984**, *323*, 287-292.

(6) Majewska, M.; Harrison, N.; Schwartz, R.; Barker, J.; Paul, S.: Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **1986**, *232*, 1004-1007.

(7) Wu, F. S.; Gibbs, T. T.; Farb, D. H.: Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacology* **1991**, *40*, 333-336.

(8) Corpéchot, C.; Robel, P.; Axelson, M.; Sjövall, J.; Baulieu, E. E.: Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, *78*, 4704-4707.

(9) Corpéchot, C.; Synguelakis, M.; Talha, S.; Axelson, M.; Sjövall, J.; Vihko, R.; Baulieu, E.-E.; Robel, P.: Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research* **1983**, *270*, 119-125.

(10) Baulieu, E. E.: Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **1998**, *23*, 963-987.

(11) Mellon, S. H.; Griffin, L. D.: Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2002**, *13*, 35-43.

(12) Pisu, M. G.; Serra, M.: Neurosteroids and neuroactive drugs in mental disorders. *Life Sciences* **2004**, *74*, 3181-3197.

(13) Mellon, S. H.; Vaudry, H.: Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. In *International Review of Neurobiology*; Giovanni Biggio, R. H. P., Ed.; Academic Press, 2001; Vol. Volume 46; pp 33-60, IN1, 61-78.

(14) Compagnone, N. A.; Mellon, S. H.: Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* **2000**, *21*, 1-56.

(15) Mellon, S. H.; Griffin, L. D.; Compagnone, N. A.: Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Research Reviews* **2001**, *37*, 3-12.

(16) Beaulieu, E.-E. e. a.: *Neurosteroids: A New Regulatory Function in the Nervous System*; Humana Press, Inc., 1999.

(17) Mensah-Nyagan, A. G.; Do-Rego, J.-L.; Beaujean, D.; Luu-The, V.; Pelletier, G.; Vaudry, H.: Neurosteroids: Expression of Steroidogenic Enzymes and Regulation of Steroid Biosynthesis in the Central Nervous System. *Pharmacological Reviews* **1999**, *51*, 63-82.

(18) Roland Sigel; Sigel, A. S., Helmut *The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins*; John Wiley & Sons, Ltd: New York, 2007.

(19) Danielson, P. B.: The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism* **2002**, *3*, 561-597.

(20) Guengerich, F. P.: Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *21*, 70-83.

(21) Williams, P. A.; Cosme, J.; Ward, A.; Angove, H. C.; Matak Vinkovic, D.; Jhoti, H.: Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **2003**, *424*, 464-468.

(22) Miller, W. L.: Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrinology Reviews* **1988**, *9*, 295-318.

(23) Stoffel-Wagner, B.: Neurosteroid Biosynthesis in the Human Brain and Its Clinical Implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2003**, *1007*, 64-78.

(24) Dubrovsky, B. O.: Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **2005**, *29*, 169-192.

(25) Mellon, S. H.: Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacology & Therapeutics* **2007**, *116*, 107-124.

(26) Compagnone, N.; Bulfone, A.; Rubenstein, J.; Mellon, S.: Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology* **1995**, *136*, 5212-5223.

(27) Martini, L.; Magnaghi, V.; Melcangi, R. C.: Actions of progesterone and its 5[alpha]-reduced metabolites on the major proteins of the myelin of the peripheral nervous system. *Steroids* **2003**, *68*, 825-829.

(28) Stapleton, G.; Steel, M.; Richardson, M.; Mason, J. O.; Rose, K. A.; Morris, R. G. M.; Lathe, R.: A Novel Cytochrome P450 Expressed Primarily in Brain. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 29739-29745.

(29) Rose, K. A.; Stapleton, G.; Dott, K.; Kieny, M. P.; Best, R.; Schwarz, M.; Russell, D. W.; Björkhem, I.; Seckl, J.; Lathe, R.: Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7α -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7α -hydroxy pregnenolone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 4925-4930.

(30) Lund, E. G.; Guileyardo, J. M.; Russell, D. W.: cDNA cloning of cholesterol 24hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 7238-7243.

(31) Ray, W. J.; Bain, G.; Yao, M.; Gottlieb, D. I.: CYP26, a Novel Mammalian Cytochrome P450, Is Induced by Retinoic Acid and Defines a New Family. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 18702-18708.

(32) Mellon, S. H.; Deschepper, C. F.: Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Research* **1993**, *629*, 283-292.

(33) King, S.; Matassa, A.; White, E.; Walsh, L.; Jo, Y.; Rao, R.; Stocco, D.; Reyland, M.: Oxysterols regulate expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Journal of Molecular Endocrinology* **2004**, *32*, 507-517.

(34) Papadopoulos, V.; Lecanu, L.; Brown, R. C.; Han, Z.; Yao, Z. X.: Peripheraltype benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* **2006**, *138*, 749-756.

(35) Schumacher, M.; Akwa, Y.; Guennoun, R.; Robert, F.; Labombarda, F.; Désarnaud, F.; Robel, P.; De Nicola, A. F.; Baulieu, E.-E.: Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects. *Journal of Neurocytology* **2000**, *29*, 307-326.

(36) Mellon, S.: Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1994**, *78*, 1003-1008.

(37) Charalampopoulos, I.; Remboutsika, E.; Margioris, A. N.; Gravanis, A.: Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in Endocrinology* & *Metabolism* **2008**, *19*, 300-307.

(38) Miller, W.; Tyrell, J.: The adrenal cortex, in: Felig, P.; Baxter, J.; Frohman, L. (Eds.). In *Endocrinology & Metabolism*; McGraw Hill: New York, 1994; pp 555-711.

(39) Rupprecht, R.; Reul, J. M. H. M.; Trapp, T.; Steensel, B. v.; Wetzel, C.; Damm, K.; Zieglgänsberger, W.; Holsboer, F.: Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* **1993**, *11*, 523-530.

(40) Griffin, L. D.; Mellon, S. H.: Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 13512-13517.

(41) Frye, C. A.: Neurosteroids' effects and mechanisms for social, cognitive, emotional, and physical functions. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, S143-S161.

(42) Boron, W. F.; Boulpaep, E. L.: *Medical Physiology: a cellular and molecular approach* Elsevier/Saunders, 2003.

(43) Azevedo, F. A. C.; Carvalho, L. R. B.; Grinberg, L. T.; Farfel, J. M.; Ferretti, R. E. L.; Leite, R. E. P.; Filho, W. J.; Lent, R.; Herculano-Houzel, S.: Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology* **2009**, *513*, 532-541.

(44) Wolosker, H.; Dumin, E.; Balan, L.; Foltyn, V. N.: d-Amino acids in the brain: d-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS Journal* **2008**, *275*, 3514-3526.

(45) Gourine, A. V.; Kasymov, V.; Marina, N.; Tang, F.; Figueiredo, M. F.; Lane, S.; Teschemacher, A. G.; Spyer, K. M.; Deisseroth, K.; Kasparov, S.: Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. *Science* **2010**, *329*, 571-575.

(46) Hu, Z. Y.; Bourreau, E.; Jung-Testas, I.; Robel, P.; Baulieu, E. E.: Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84*, 8215-8219.

(47) Jung-Testas, I.; Hu, Z. Y.; Baulieu, E. E.; Robel, P.: Neurosteroids: Biosynthesis of Pregnenolone and Progesterone in Primary Cultures of Rat Glial Cells. *Endocrinology* **1989**, *125*, 2083-2091.

(48) Baulieu, E.-E.; Robel, P.: Neurosteroids: A new brain function? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1990**, *37*, 395-403.

(49) Akwa, Y.; Young, J.; Kabbadj, K.; Sancho, M. J.; Zucman, D.; Vourc'h, C.; Jung-Testas, I.; Hu, Z. Y.; Le Goascogne, C.; Jo, D. H.; Corpéchot, C.; Simon, P.; Baulieu, E. E.; Robel, P.: Neurosteroids: Biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1991**, *40*, 71-81.

(50) Baulieu, E. E.: Neurosteroids: a new function in the brain. *Biology of the cell* **1991**, *71*, 3-10.

(51) Papadopoulos, V.; Guarneri, P.; Kreuger, K. E.; Guidotti, A.; Costa, E.: Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 5113-5117.

(52) Usui, M.; Yamazaki, T.; Kominami, S.; Tsutsui, K.: Avian neurosteroids. II. Localization of a cytochrome P450scc-like substance in the quail brain. *Brain Research* **1995**, *678*, 10-20.

(53) Tsutsui, K.; Yamazaki, T.; Usui, M.; Furukawa, Y.; Ukena, K.; Kohchi, C.; al., e.: P450scc activity in the brain. In *Perspectives in Avian Endocrinology. Journal of Endocrinology*; Harvey, S., Etches, R. J., Eds.: Bristol, 1997a.

(54) Tsutsui, K.; Usui, M.; Yamazaki, T.; Ukena, K.; Kominami, S.: Neurosteroids in the avian brain. In *Frontiers in Environmental and Metabolic Endocrinology*; Maitra, S. K., Ed.; Burdwan Press: Burdwan, 1997b.

(55) Ukena, K.; Usui, M.; Kohchi, C.; Tsutsui, K.: Cytochrome P450 Side-Chain Cleavage Enzyme in the Cerebellar Purkinje Neuron and Its Neonatal Change in Rats. *Endocrinology* **1998**, *139*, 137-147.

(56) Takase, M.; Ukena, K.; Yamazaki, T.; Kominami, S.; Tsutsui, K.: Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. *Endocrinology* **1999**, *140*, 1936-1944.

(57) King, S. R.; Manna, P. R.; Ishii, T.; Syapin, P. J.; Ginsberg, S. D.; Wilson, K.; Walsh, L. P.; Parker, K. L.; Stocco, D. M.; Smith, R. G.; Lamb, D. J.: An Essential Component in Steroid Synthesis, the Steroidogenic Acute Regulatory Protein, Is Expressed in Discrete Regions of the Brain. *The Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, 10613-10620.

(58) Kimoto, T.; Tsurugizawa, T.; Ohta, Y.; Makino, J. y.; Tamura, H.-o.; Hojo, Y.; Takata, N.; Kawato, S.: Neurosteroid Synthesis by Cytochrome P450-Containing Systems Localized in the Rat Brain Hippocampal Neurons: N-Methyl-d-Aspartate and Calcium-Dependent Synthesis. *Endocrinology* **2001**, *142*, 3578-3589.

(59) Agís-Balboa, R. C.; Pinna, G.; Zhubi, A.; Maloku, E.; Veldic, M.; Costa, E.; Guidotti, A.: Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 14602-14607.

(60) Kawato, S.: *Optical analysis of steroid signal transduction in brain and adrenal cortex. In: Advance in Biophysics*; Academic Press: New York, 2000.

(61) Guarneri, P.; Guarneri, R.; Cascio, C.; Pavasant, P.; Piccoli, F.; Papadopoulos, V.: Neurosteroidogenesis in Rat Retinas. *Journal of Neurochemistry* **1994**, *63*, 86-96.

(62) Compagnone, N.; Bulfone, A.; Rubenstein, J.; Mellon, S.: Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* **1995**, *136*, 2689-2696.

(63) Seyle, H.: The anesthesic effets of steroid hormones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1941**, *46*, 106-112.

(64) Lambert, J. J.; Belelli, D.; Hill-Venning, C.; Callachan, H.; Peters, J. A.: Neurosteroid modulation of native and recombinant GABA_A receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology* **1996**, *16*, 155-174.

(65) Rupprecht, P.: Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoendocrinology* **2003**, *28*, 139-168.

(66) Koenig, H.; Schumacher, M.; Ferzaz, B.; Thi, A.; Ressouches, A.; Guennoun, R.; Jung-Testas, I.; Robel, P.; Akwa, Y.; Baulieu, E.: Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* **1995**, *268*, 1500-1503.

(67) Jung-Testas, I.; Renoir, J. M.; Gasc, J. M.; Baulieu, E. E.: Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Experimental Cell Research* **1991**, *193*, 12-19.

(68) Plassart-Schiess, E.; Baulieu, E.-E.: Neurosteroids: recent findings. *Brain Research Reviews* **2001**, *37*, 133-140.

(69) Schumacher, M.; Coirini, H.; Johnson, A. E.; Flanagan, L. M.; Frankfurt, M.; Pfaff, D. W.; McEwen, B. S.: The oxytocin receptor: a target for steroid hormones. *Regulatory Peptides* **1993**, *45*, 115-119.

(70) Parsons, B.; Rainbow, T.; MacLusky, N.; McEwen, B.: Progestin receptor levels in rat hypothalamic and limbic nuclei. *The Journal of Neuroscience* **1982**, *2*, 1446-1452.

(71) Power, R. F.; Conneely, O. M.; O'Malley, B. W.: New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends in Pharmacological Sciences* **1992**, *13*, 318-323.

(72) Jung-Testas, I.; Weintraub, H.; Dupuis, D.; Eychenne, B.; Baulieu, E.-E.; Robel, P.: Low density lipoprotein-receptors in primary cultures of rat glial cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1992**, *42*, 597-605.

(73) Matus, A.: Microtubule-Associated Proteins: Their Potential Role in Determining Neuronal Morphology. *Annual Review of Neuroscience* **1988**, *11*, 29-44.

(74) Tucker, R. P.: The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Research Reviews* **1990**, *15*, 101-120.

(75) Compagnone, N. A.; Mellon, S. H.: Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 4678-4683.

(76) Hamel, E.; Lin, C. M.; Flynn, E.; D'Amato, R. J.: Interactions of 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Mammalian Metabolite, with Unpolymerized Tubulin and with Tubulin Polymers. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1304-1310.

(77) Watanabe, M.; Maemura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H.: GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. In *International Review of Cytology*; Kwang, W. J., Ed.; Academic Press, 2002; Vol. Volume 213; pp 1-47.

(78) Petroff, O. A. C.: Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. *The Neuroscientist* **2002**, *8*, 562-573.

(79) Schousboe, A.; Waagepetersen, H. S.: GABA: Homeostatic and pharmacological aspects. In *Progress in Brain Research*; James M. Tepper, E. D. A., Bolam, J. P., Eds.; Elsevier, 2007; Vol. Volume 160; pp 9-19.

(80) Burt, D. R.: Reducing GABA Receptors. *Life Sciences* **2003**, *73*, 1741-1758.

(81) Davis, J. B.; Maher, P.: Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Research* **1994**, *652*, 169-173.

(82) Whiting, P. J.; McKernan, R. M.; Wafford, K. A.: Structure and Pharmacology of Vertebrate GABA_A Receptor Subtypes. In *International Review of Neurobiology*; Ronald, J. B., Harris, R. A., Eds.; Academic Press, 1995; Vol. Volume 38; pp 95-138.

(83) Smith, T. A.: Type A g-aminobutyric acid ($GABA_A$) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *British Journal of Biomedical Science* **2001**, *58*, 111-121.

(84) Billinton, A.; Ige, A. O.; Bolam, J. P.; White, J. H.; Marshall, F. H.; Emson, P. C.: Advances in the molecular understanding of GABAB receptors. *Trends in Neurosciences* **2001**, *24*, 277-282.

(85) Hammond, D. L.: $GABA_B$ receptors: new tricks by an old dog. *Current Opinion in Pharmacology* **2001**, *1*, 26-30.

(86) Manev, H.; Dimitrijevic, N.: Drosophila model for in vivo pharmacological analgesia research. *European Journal of Pharmacology* **2004**, *491*, 207-208.

(87) Dzitoyeva, S.; Gutnov, A.; Imbesi, M.; Dimitrijevic, N.; Manev, H.: Developmental role of $GABA_B(1)$ receptors in Drosophila. *Developmental Brain Research* **2005**, *158*, 111-114.

(88) Feigenspan, A.; Wassle, H.; Bormann, J.: Pharmacology of GABA receptor Clchannels in rat retinal bipolar cells. *Nature* **1993**, *361*, 159-162.

(89) Schofield, P. R.; Darlison, M. G.; Fujita, N.; Burt, D. R.; Stephenson, F. A.; Rodriguez, H.; Rhee, L. M.; Ramachandran, J.; Reale, V.; Glencorse, T. A.; Seeburg, P. H.; Barnard, E. A.: Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligandgated receptor super-family. *Nature* **1987**, *328*, 221-227.

(90) Maricq, A.; Peterson, A.; Brake, A.; Myers, R.; Julius, D.: Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* **1991**, *254*, 432-437.

(91) Ernst, M.; Bruckner, S.; Boresch, S.; Sieghart, W.: Comparative models of GABA_A receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. *Molecular Pharmacology* **2005**, *68*, 1291-1300.

(92) Burt, D.; Kamatchi, G.: GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *The FASEB Journal* **1991**, *5*, 2916-2923.

(93) Connolly, C. N.; Krishek, B. J.; McDonald, B. J.; Smart, T. G.; Moss, S. J.: Assembly and Cell Surface Expression of Heteromeric and Homomeric -Aminobutyric Acid Type A Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 89-96.

(94) McKernan, R. M.; Whiting, P. J.: Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends in Neurosciences* **1996**, *19*, 139-143.

(95) Cossart, R.; Bernard, C.; Ben-Ari, Y.: Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends in Neurosciences* **2005**, *28*, 108-115.

(96) Macdonald, R. L.; Olsen, R. W.: GABA_A Receptor Channels. *Annual Review of Neuroscience* **1994**, *17*, 569-602.

(97) Aprison, M. H.; Galvez-Ruano, E.; Robertson, D. H.; Lipkowitz, K. B.: Glycine and GABA receptors: Molecular mechanisms controlling chloride ion flux. *Journal of Neuroscience Research* **1996**, *43*, 372-381.

(98) Simeone, T. A.; Donevan, S. D.; Rho, J. M.: Molecular Biology and Ontogeny of γ-Aminobutyric Acid (GABA) Receptors in the Mammalian Central Nervous System. *Journal of Child Neurology* **2003**, *18*, 39-48.

(99) Johnston, G. A. R.: GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* **1996**, *69*, 173-198.

(100) Chebib, M.; Johnston, G. A. R.: GABA-Activated Ligand Gated Ion Channels: Medicinal Chemistry and Molecular Biology. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 1427-1447.

(101) Lambert, J. J.; Harney, S. C.; Belelli, D.; Peters, J. A.: Neurosteroid modulation of recombinant and synaptic GABA_A receptors. In *International Review of Neurobiology*; Giovanni Biggio, R. H. P., Ed.; Academic Press, 2001; Vol. Volume 46; pp 177-205.

(102) Diamond, I.; Gordon, A. S.: Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiological Reviews* **1997**, *77*, 1-20.

(103) Harris, R. A.: Ethanol Actions on Multiple Ion Channels: Which Are Important? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **1999**, *23*, 1563-1570.

(104) Morrow, A. L.; VanDoren, M. J.; Penland, S. N.; Matthews, D. B.: The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Research Reviews* **2001**, *37*, 98-109.

(105) Souli, C.; Avlonitis, N.; Calogeropoulou, T.; Tsotinis, A.; Maksay, G.; Bíró, T.; Politi, A.; Mavromoustakos, T.; Makriyannis, A.; Reis, H.; Papadopoulos, M.: Novel 17*6*-substituted conformationally constrained neurosteroids that modulate GABA_A receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5203-5214.

(106) Essrich, C.; Lorez, M.; Benson, J. A.; Fritschy, J. M.; Luscher, B.: Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires

the γ2 subunit and gephyrin. *Nature Neuroscience* **1998**, *1*, 563-571.

(107) Fritschy, J.-M.; Brünig, I.: Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacology & Therapeutics* **2003**, *98*, 299-323.

(108) Schweizer, C.; Balsiger, S.; Bluethmann, H.; Mansuy, I. M.; Fritschy, J.-M.; Mohler, H.; Lüscher, B.: The γ 2 subunit of GABA_A receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2003**, *24*, 442-450.

(109) Kennedy, R. T.; Thompson, J. E.; Vickroy, T. W.: In vivo monitoring of amino acids by direct sampling of brain extracellular fluid at ultralow flow rates and capillary electrophoresis. *Journal of Neuroscience Methods* **2002**, *114*, 39-49.

(110) Caraiscos, V. B.; Elliott, E. M.; You-Ten, K. E.; Cheng, V. Y.; Belelli, D.; Newell, J. G.; Jackson, M. F.; Lambert, J. J.; Rosahl, T. W.; Wafford, K. A.; MacDonald, J. F.; Orser, B. A.: Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by α5

subunit-containing γ-aminobutyric acid type A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 3662-3667.

(111) Keller, A. F.; Breton, J.-D.; Schlichter, R.; Poisbeau, P.: Production of 5α -Reduced Neurosteroids Is Developmentally Regulated and Shapes GABA_A Miniature IPSCs in Lamina II of the Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* **2004**, *24*, 907-915.

(112) Smart, T. G.: Handling accumulated internal Cl⁻ at inhibitory synapses. *Nature Neuroscience* **2010**, *13*, 1043-1044.

(113) Belelli, D.; Pistis, M.; Peters, J. A.; Lambert, J. J.: General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **1999**, *20*, 496-502.

(114) Belelli, D.; Casula, A.; Ling, A.; Lambert, J. J.: The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA_A receptors. *Neuropharmacology* **2002**, *43*, 651-661.

(115) Brown, N.; Kerby, J.; Bonnert, T. P.; Whiting, P. J.; Wafford, K. A.: Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA_A receptors. *British Journal of Pharmacology* **2002**, *136*, 965-974.

(116) Wohlfarth, K. M.; Bianchi, M. T.; Macdonald, R. L.: Enhanced Neurosteroid Potentiation of Ternary GABAAReceptors Containing the δ Subunit. *The Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, 1541-1549.

(117) Bianchi, M. T.; Macdonald, R. L.: Neurosteroids Shift Partial Agonist Activation of GABA_A Receptor Channels from Low- to High-Efficacy Gating Patterns. *The Journal of Neuroscience* **2003**, *23*, 10934-10943.

(118) Belelli, D.; Herd, M. B.: The Contraceptive Agent Provera Enhances GABA_A Receptor-Mediated Inhibitory Neurotransmission in the Rat Hippocampus: Evidence for Endogenous Neurosteroids? *The Journal of Neuroscience* **2003**, *23*, 10013-10020.

(119) Porcello, D. M.; Huntsman, M. M.; Mihalek, R. M.; Homanics, G. E.; Huguenard, J. R.: Intact Synaptic GABAergic Inhibition and Altered Neurosteroid Modulation of Thalamic Relay Neurons in Mice Lacking δ Subunit. *Journal of Neurophysiology* **2003**, *89*, 1378-1386.

(120) Stell, B. M.; Brickley, S. G.; Tang, C. Y.; Farrant, M.; Mody^{*}, I.: Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by δ subunit-containing GABA_A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 14439-14444.

(121) Smith, S. S.; Gong, Q. H.; Hsu, F.-C.; Markowitz, R. S.; ffrench-Mullen, J. M. H.; Li, X.: $GABA_A$ receptor $\alpha 4$ subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* **1998**, *392*, 926-929.

(122) Smith, S. S.; Gong, Q. H.; Li, X.; Moran, M. H.; Bitran, D.; Frye, C. A.; Hsu, F.-C.: Withdrawal from 3α -OH- 5α -Pregnan-20-One Using a Pseudopregnancy Model Alters the Kinetics of Hippocampal GABA_A-Gated Current and Increases the GABA_AReceptor α 4 Subunit in Association with Increased Anxiety. *The Journal of Neuroscience* **1998**, *18*, 5275-5284.

(123) Gulinello, M.; Orman, R.; Smith, S. S.: Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the α 4 subunit of the GABA_A receptor in the amygdala after progesterone withdrawal. *European Journal of Neuroscience* **2003**, *17*, 641-648.

(124) Hsu, F.-C.; Smith, S. S.: Progesterone Withdrawal Reduces Paired-Pulse Inhibition in Rat Hippocampus: Dependence on GABA_A Receptor α 4 Subunit Upregulation. *Journal of Neurophysiology* **2003**, *89*, 186-198.

(125) Smith, S. S.; Gong, Q. H.: Neurosteroid administration and withdrawal alter GABA_A receptor kinetics in CA1 hippocampus of female rats. *The Journal of Physiology* **2005**, *564*, 421-436.

(126) Belelli, D.; Herd, M. B.; Mitchell, E. A.; Peden, D. R.; Vardy, A. W.; Gentet, L.; Lambert, J. J.: Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: Mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience* **2006**, *138*, 821-829.

(127) Harney, S. C.; Frenguelli, B. G.; Lambert, J. J.: Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABA_A receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. *Neuropharmacology* **2003**, *45*, 873-883.

(128) Brussaard, A. B.; Wossink, J.; Lodder, J. C.; Kits, K. S.: Progesteronemetabolite prevents protein kinase C-dependent modulation of γ-aminobutyric acid type A receptors in oxytocin neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 3625-3630.

(129) Moss, S. J.; Smart, T. G.: Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neuroscience* **2001**, *2*, 240-250.

(130) Smart, T.; Thomas, P.; Brandon, N.; Moss, S.: Heterologous regulation of GABA_A receptors protein phosphorylation. In *Pharmacology of GABA and glycine transmission*; Mohler, H., Ed.: Berlin, 2001; Vol. 150; pp 195-226.

(131) Kneussel, M.; Betz, H.: Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *The Journal of Physiology* **2000**, *525*, 1-9.

(132) Herd, M. B.; Belelli, D.; Lambert, J. J.: Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **2007**, *116*, 20-34.

(133) Hodge, C. W.; Mehmert, K. K.; Kelley, S. P.; McMahon, T.; Haywood, A.; Olive, M. F.; Wang, D.; Sanchez-Perez, A. M.; Messing, R. O.: Supersensitivity to allosteric GABA_A receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCε. *Nature Neuroscience*

1999, *2*, 997-1002.

(134) Vautrin, J.; Schaffner, A. E.; Barker, J. L.: Fast presynaptic GABA_A receptormediated Cl⁻ conductance in cultured rat hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* **1994**, *479*, 53-63.

(135) MacDermott, A. B.; Role, L. W.; Siegelbaum, S. A.: Presynaptic ionotropic receptors and the contro of transmitter release. *Annual Review of Neuroscience* **1999**, *22*, 443-485.

(136) Ruiz, A.; Fabian-Fine, R.; Scott, R.; Walker, M. C.; Rusakov, D. A.; Kullmann, D. M.: GABA_A Receptors at Hippocampal Mossy Fibers. *Neuron* **2003**, *39*, 961-973.

(137) Axmacher, N.; Draguhn, A.: Inhibition of GABA release by presynaptic ionotropic GABA receptors in hippocampal CA3. *NeuroReport* **2004**, *15*, 329-334.

(138) Haage, D.; Druzin, M.; Johansson, S.: Allopregnanolone modulates spontaneous GABA release via presynaptic Cl- permeability in rat preoptic nerve terminals. *Brain Research* **2002**, *958*, 405-413.

(139) Haage, D.; Bäckström, T.; Johansson, S.: Interaction between allopregnanolone and pregnenolone sulfate in modulating GABA-mediated synaptic currents in neurons from the rat medial preoptic nucleus. *Brain Research* **2005**, *1033*, 58-67.

(140) Ben-Ari, Y.: Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* **2002**, *3*, 728-739.

(141) Barker, J. L.; Harrison, N. L.; Lange, G. D.; Owen, D. G.: Potentiation of gamma-aminobutyric-acid-activated chloride conductance by a steroid anaesthetic in cultured rat spinal neurones. *The Journal of Physiology* **1987**, *386*, 485-501.

(142) Callachan, H.; Cottrell, G. A.; Hather, N. Y.; Lambert, J. J.; Nooney, J. M.; Peters, J. A.: Modulation of the GABA_A Receptors by Progesterone Metabolites. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **1987**, *231*, 359-369.

(143) Cottrell, G. A.; Lambert, J. J.; Peters, J. A.: Modulation of GABA_A receptor activity by alphaxalone. *British Journal of Pharmacology* **1987**, *90*, 491-500.

(144) Lambert, J. J.; Peters, J. A.; Cottrell, G. A.: Actions of synthetic and endogenous steroids on the GABAA receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* **1987**, *8*, 224-227.

(145) Twyman, R. E.; Macdonald, R. L.: Neurosteroid regulation of GABA_A receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *The Journal of Physiology* **1992**, *456*, 215-245.

(146) Brussaard, A. B.; Kits, K. S.; Baker, R. E.; Willems, W. P. A.; Leyting-Vermeulen, J. W.; Voorn, P.; Smit, A. B.; Bicknell, R. J.; Herbison, A. E.: Plasticity in Fast Synaptic Inhibition of Adult Oxytocin Neurons Caused by Switch in GABA_A Receptor Subunit Expression. *Neuron* **1997**, *19*, 1103-1114.

(147) Cooper, E. J.; Johnston, G. A. R.; Edwards, F. A.: Effects of a naturally occurring neurosteroid on GABA_A IPSCs during development in rat hippocampal or cerebellar slices. *The Journal of Physiology* **1999**, *521*, 437-449.

(148) Jorge-Rivera, J. C.; McIntyre, K. L.; Henderson, L. P.: Anabolic Steroids Induce Region- and Subunit-Specific Rapid Modulation of GABA_A Receptor-Mediated Currents in the Rat Forebrain. *Journal of Neurophysiology* **2000**, *83*, 3299-3309.

(149) Lambert, J. J.; Belelli, D.; Peden, D. R.; Vardy, A. W.; Peters, J. A.: Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Progress in Neurobiology* **2003**, *71*, 67-80.

(150) Cope, D. W.; Hughes, S. W.; Crunelli, V.: GABA_A Receptor-Mediated Tonic Inhibition in Thalamic Neurons. *The Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, 11553-11563.

(151) Schwabe, K.; Gavrilovici, C.; McIntyre, D. C.; Poulter, M. O.: Neurosteroids Exhibit Differential Effects on mIPSCs Recorded From Normal and Seizure Prone Rats. *Journal of Neurophysiology* **2005**, *94*, 2171-2181.

(152) Kaminski, R. M.; Marini, H.; Ortinski, P. I.; Vicini, S.; Rogawski, M. A.: The Pheromone Androstenol (5α -Androst-16-en- 3α -ol) Is a Neurosteroid Positive Modulator of GABA_A Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2006**, *317*, 694-703.

(153) Glykys, J.; Peng, Z.; Chandra, D.; Homanics, G. E.; Houser, C. R.; Mody, I.: A new naturally occurring GABA_A receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nature Neuroscience* **2007**, *10*, 40-48.

(154) Shen, H.; Gong, Q. H.; Aoki, C.; Yuan, M.; Ruderman, Y.; Dattilo, M.; Williams, K.; Smith, S. S.: Reversal of neurosteroid effects at $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA_A receptors triggers anxiety at puberty. *Nature Neuroscience* **2007**, *10*, 469-477.

(155) Scimemi, A.; Semyanov, A.; Sperk, G.; Kullmann, D. M.; Walker, M. C.: Multiple and Plastic Receptors Mediate Tonic GABA_A Receptor Currents in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, 10016-10024.

(156) Glykys, J.; Mody, I.: Hippocampal Network Hyperactivity After Selective Reduction of Tonic Inhibition in GABA_A Receptor α 5 Subunit^DDeficient Mice. *Journal of Neurophysiology* **2006**, *95*, 2796-2807.

(157) Prenosil, G. A.; Schneider Gasser, E. M.; Rudolph, U.; Keist, R.; Fritschy, J.-M.; Vogt, K. E.: Specific Subtypes of GABA_A Receptors Mediate Phasic and Tonic Forms of Inhibition in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology* **2006**, *96*, 846-857.

(158) Maguire, J.; Mody, I.: Steroid hormone fluctuations and GABA_AR plasticity. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, S84-S90.

(159) Phillipps, G. H.: Structure-activity relationships in steroidal anaesthetics. *Journal of Steroid Biochemistry* **1975**, *6*, 607-613.

(160) Wittmer, L. L.; Hu, Y.; Kalkbrenner, M.; Evers, A. S.; Zorumski, C. F.; Covey, D. F.: Enantioselectivity of steroid-induced gamma-aminobutyric acidA receptor modulation and anesthesia. *Molecular Pharmacology* **1996**, *50*, 1581-1586.

(161) Hu, Y.; L. Wittmer, L.; Kalkbrenner, M.; S. Evers, A.; F. Zorumski, C.; F. Covey, D.: Neurosteroid analogues. Part 5.1 Enantiomers of neuroactive steroids and benz[e]indenes: total synthesis, electrophysiological effects on GABAA receptor function and anesthetic actions in tadpoles. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1 **1997**, 3665-3672.

(162) Li, W.; Covey, D. F.; Alakoskela, J.-M.; Kinnunen, P. K. J.; Steinbach, J. H.: Enantiomers of Neuroactive Steroids Support a Specific Interaction with the GABA-C Receptor as the Mechanism of Steroid Action. *Molecular Pharmacology* **2006**, *69*, 1779-1782.

(163) Li, P.; Bracamontes, J.; Katona, B. W.; Covey, D. F.; Steinbach, J. H.; Akk, G.: Natural and Enantiomeric Etiocholanolone Interact with Distinct Sites on the Rat $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA Receptor. *Molecular Pharmacology* **2007**, *71*, 1582-1590.

(164) Westover, E. J.; Covey, D. F.: The Enantiomer of Cholesterol. *Journal of Membrane Biology* **2004**, *202*, 61-72.

(165) Covey, D. F.: ent-Steroids: Novel tools for studies of signaling pathways. *Steroids* **2009**, *74*, 577-585.

(166) Hosie, A. M.; Wilkins, M. E.; da Silva, H. M. A.; Smart, T. G.: Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **2006**, *444*, 486-489.

(167) Hosie, A. M.; Clarke, L.; da Silva, H.; Smart, T. G.: Conserved site for neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 149-154.

(168) Akk, G.; Li, P.; Bracamontes, J.; Steinbach, J. H.: Activation and Modulation of Concatemeric GABA-A Receptors Expressed in Human Embryonic Kidney Cells. *Molecular Pharmacology* **2009**, *75*, 1400-1411.

(169) Bracamontes, J. R.; Steinbach, J. H.: Steroid Interaction with a Single Potentiating Site Is Sufficient to Modulate GABA-A Receptor Function. *Molecular Pharmacology* **2009**, *75*, 973-981.

(170) Chisari, M.; Eisenman, L. N.; Covey, D. F.; Mennerick, S.; Zorumski, C. F.: The sticky issue of neurosteroids and GABA_A receptors. *Trends in Neurosciences* **2010**, *33*, 299-306.

(171) Akk, G.; Shu, H.-J.; Wang, C.; Steinbach, J. H.; Zorumski, C. F.; Covey, D. F.; Mennerick, S.: Neurosteroid Access to the GABA_A Receptor. *The Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, 11605-11613.

(172) Li, P.; Shu, H.-J.; Wang, C.; Mennerick, S.; Zorumski, C. F.; Covey, D. F.; Steinbach, J. H.; Akk, G.: Neurosteroid migration to intracellular compartments reduces steroid concentration in the membrane and diminishes GABA-A receptor potentiation. *The Journal of Physiology* **2007**, *584*, 789-800.

(173) Chisari, M.; Eisenman, L. N.; Krishnan, K.; Bandyopadhyaya, A. K.; Wang, C.; Taylor, A.; Benz, A.; Covey, D. F.; Zorumski, C. F.; Mennerick, S.: The Influence of Neuroactive Steroid Lipophilicity on GABAA Receptor Modulation: Evidence for a Low-Affinity Interaction. *Journal of Neurophysiology* **2009**, *102*, 1254-1264.

(174) Shu, H. J.; Zeng, C. M.; Wang, C.; Covey, D. F.; Zorumski, C. F.; Mennerick, S.: Cyclodextrins sequester neuroactive steroids and differentiate mechanisms that rate limit steroid actions. *British Journal of Pharmacology* **2007**, *150*, 164-175.

(175) Bowlby, M. R.: Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Molecular Pharmacology* **1993**, *43*, 813-819.

(176) Orser, B. A.; Pennefather, P. S.; MacDonald, J. F.: Multiple Mechanisms of Ketamine Blockade of N-methyl-D-aspartate Receptors. *Anesthesiology* **1997**, *86*, 903-917.

(177) Treistman, S. N.; Martin, G. E.: BK Channels: mediators and models for alcohol tolerance. *Trends in Neurosciences* **2009**, *32*, 629-637.

(178) Makriyannis, A.; Tian, X.; Guo, J.: How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **2005**, *77*, 210-218.

(179) Lee, S.-Y.; MacKinnon, R.: A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom. *Nature* **2004**, *430*, 232-235.

(180) Suchyna, T. M.; Tape, S. E.; Koeppe, R. E.; Andersen, O. S.; Sachs, F.; Gottlieb, P. A.: Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers. *Nature* **2004**, *430*, 235-40.

(181) Lambert, J. J.; Belelli, D.; Hill-Venning, C.; Peters, J. A.: Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends in Pharmacological Sciences* **1995**, *16*, 295-303.

(182) Zorumski, C. F.; Wittmer, L. L.; Isenberg, K. E.; Yuefei, H. U.; Covey, D. F.: Effects of Neurosteroid and Benz[e]indene Enantiomers on GABA_A Receptors in Cultured Hippocampal Neurons and Transfected HEK-293 Cells. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 1161-1168.

(183) Li, F.; Tsien, J. Z.: Memory and the NMDA Receptors. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*, 302-303.

(184) Moriyoshi, K.; Masu, M.; Ishii, T.; Shigemoto, R.; Mizuno, N.; Nakanishi, S.: Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **1991**, *354*, 31-37.

(185) Paoletti, P.; Neyton, J.: NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* **2007**, *7*, 39-47.

(186) Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D.; Hall, W. C.; LaMantia, A.-S.; McNamara, J. O.; White, L. E.: *Neuroscience*; 4th ed.; Sinauer Associates, 2008.

(187) Kumari, M.; Ticku, M. K.: Ethanol and Regulation of the NMDA Receptor Subunits in Fetal Cortical Neurons. *Journal of Neurochemistry* **1998**, *70*, 1467-1473.

(188) Fahey, J. M.; Lindquist, D. G.; Pritchard, G. A.; Miller, L. G.: Pregnenolone sulfate potentiation of NMDA-mediated increases in intracellular calcium in cultured chick cortical neurons. *Brain Research* **1995**, *669*, 183-188.

(189) Mathis, C.; Vogel, E.; Cagniard, B.; Criscuolo, F.; Ungerer, A.: The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks deficits induced by a competitive NMDA antagonist in active avoidance and lever-press learning tasks in mice. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 1057-1064.

(190) Hanner, M.; Moebius, F. F.; Flandorfer, A.; Knaus, H. G.; Striessnig, J.; Kempner, E.; Glossmann, H.: Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 8072-8077.

(191) Monnet, F. P.; Mahé, V.; Robel, P.; Baulieu, E. E.: Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 3774-3778.

(192) Yakel, J. L.: The 5-HT3 receptor channel: function, activation and regulation. In *Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors*; Endo, M., Kurachi, Y., Mishina, M., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 2000; Vol. 147; pp 541-560.

(193) Férézou, I.; Cauli, B.; Hill, E. L.; Rossier, J.; Hamel, E.; Lambolez, B.: 5-HT3 Receptors Mediate Serotonergic Fast Synaptic Excitation of Neocortical Vasoactive Intestinal Peptide/Cholecystokinin Interneurons. *The Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, 7389-7397.

(194) Van Hooft, J. A.; Vijverberg, H. P. M.: 5-HT3 receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story? *Trends in Neurosciences* **2000**, *23*, 605-610.

(195) Rammes, G.; Eisensamer, B.; Ferrari, U.; Shapa, M.; Gimpl, G.; Gilling, K.; Parsons, C.; Riering, K.; Hapfelmeier, G.; Bondy, B.; Zieglgansberger, W.; Holsboer, F.; Rupprecht, R.: Antipsychotic drugs antagonise human serotonin type 3 (5-HT3) receptor currents in a noncompetitive manner. *Molecular Psychiatry* **2004**, *9*, 818-818.
(196) Wetzel, C. H. R.; Hermann, B.; Behl, C.; Pestel, E.; Rammes, G.; Zieglgänsberger, W.; Holsboer, F.; Rupprecht, R.: Functional Antagonism of Gonadal Steroids at the 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptor. *Molecular Endocrinology* **1998**, *12*, 1441-1451.

(197) Lynch, J. W.: Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiological Reviews* **2004**, *84*, 1051-1095.

(198) Reichling, D. B.; Kyrozis, A.; Wang, J.; MacDermott, A. B.: Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *The Journal of Physiology* **1994**, *476*, 411-421.

(199) Maksay, G.; Laube, B.; Betz, H.: Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. *Neuropharmacology* **2001**, *41*, 369-376.

(200) Wu, F. S.; Gibbs, T. T.; Farb, D. H.: Inverse modulation of gammaaminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Molecular Pharmacology* **1990**, *37*, 597-602.

(201) Purdy, R. H.; Morrow, A. L.; Moore, P. H.; Paul, S. M.: Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 4553-4557.

(202) Morrow, A. L.; Devaud, L. L.; Purdy, R. H.; Paul, S. M.: Neuroactive Steroid Modulators of the Stress Response. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1995**, *771*, 257-272.

(203) Barbaccia, M. L.; Roscetti, G.; Trabucchi, M.; Mostallino, M. C.; Concas, A.; Purdy, R. H.; Biggio, G.: Time-Dependent Changes in Rat Brain Neuroactive Steroid Concentrations and GABA_A Receptor Function after Acute Stress. *Neuroendocrinology* **1996**, *63*, 166-172.

(204) Grobin, A. C.; Roth, R. H.; Deutch, A. Y.: Regulation of the prefrontal cortical dopamine system by the neuroactive steroid 3a,21-dihydroxy-5a-pregnane-20-one. *Brain Research* **1992**, *578*, 351-356.

(205) Zimmerberg, B.; Brown, R. C.: Prenatal experience and postnatal stress modulate the adult neurosteroid and catecholaminergic stress responses. *International Journal of Developmental Neuroscience* **1998**, *16*, 217-228.

(206) Tait, G. R.; McManus, K.; Bellavance, F.; Nathalie, L.; Chrapko, W.; Le Mellédo, J.-M.: Neuroactive steroid changes in response to challenge with the panicogenic agent pentagastrin. *Psychoneuroendocrinology* **2002**, *27*, 417-429.

Eser, D.; di Michele, F.; Zwanzger, P.; Pasini, A.; Baghai, T. C.; Schule, C.; (207) Rupprecht, R.; Romeo, E.: Panic induction with cholecystokinin-tetrapeptide (CCK-4) increases plasma concentrations of the neuroactive steroid 3α,5αtetrahydrodeoxycorticosterone $(3\alpha, 5\alpha$ -THDOC) healthy in volunteers. Neuropsychopharmacology 2005, 30, 192-195.

(208) Engel, S. R.; Grant, K. A.: Neurosteroids and behavior. In *International Review of Neurobiology*; Giovanni Biggio, R. H. P., Ed.; Academic Press, 2001; Vol. Volume 46; pp 321-348.

(209) Akwa, Y.; Purdy, R. H.; Koob, G. F.; Britton, K. T.: The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolone in rat. *Behavioural Brain Research* **1999**, *106*, 119-125.

(210) Majewska, M. D.: Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology* **1992**, *38*, 379-394.

(211) Prasad, A.; Imamura, M.; Prasad, C.: Dehydroepiandrosterone Decreases Behavioral Despair in High-but not Low-Anxiety Rats. *Physiology & Behavior* **1997**, *62*, 1053-1057.

(212) Melchior, C. L.; Ritzmann, R. F.: Dehydroepiandrosterone is an anxiolytic in mice mice on the plus maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1994**, *47*, 437-441.

(213) Samba Reddy, D.; Kulkarni, S. K.: The role of GABA-A and mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptors on the effects of neurosteroids on food intake in mice. *Psychopharmacology* **1998**, *137*, 391-400.

(214) Melchior, C. L.; Ritzmann, R. F.: Pregnenolone and pregnenolone sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1994**, *48*, 893-897.

(215) Purdy, R. H.; Moore, P. H.; Morrow, A. L.; Paul, S. M.: Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Advances in biochemical psychopharmacology* **1992**, *47*, 87-92.

(216) Frye, C. A.; Reed, T. A. W.: Androgenic neurosteroids: anti-seizure effects in an animal model of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology* **1998**, *23*, 385-399.

(217) Mayo, W.; Dellu, F.; Robel, P.; Cherkaoui, J.; Le Moal, M.; Baulieu, E.-E.; Simon, H.: Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Research* **1993**, *607*, 324-328.

(218) Ladurelle, N.; Eychenne, B.; Denton, D.; Blair-West, J.; Schumacher, M.; Robel, P.; Baulieu, E.-E.: Prolonged intracerebroventricular infusion of neurosteroids affects cognitive performances in the mouse. *Brain Research* **2000**, *858*, 371-379.

(219) Frye, C. A.; Sturgis, J. D.: Neurosteroids Affect Spatial/Reference, Working, and Long-Term Memory of Female Rats. *Neurobiology of Learning and Memory* **1995**, *64*, 83-96.

(220) Van Broekhoven, F.; Verkes, R.: Neurosteroids in depression: a review. *Psychopharmacology* **2003**, *165*, 97-110.

(221) Phan, V.-L.; Su, T.-P.; Privat, A.; Maurice, T.: Modulation of steroidal levels by adrenalectomy/castration and inhibition of neurosteroid synthesis enzymes affect σ1 receptor-mediated behaviour in mice. *European Journal of Neuroscience* **1999**, *11*, 2385-2396.

(222) Ojeda, S. R.; Andrews, W. W.; Advis, J. P.; White, S. S.: Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. *Endocrine Reviews* **1980**, *1*, 228-257.

(223) Morrell, M. J.: Hormones and Epilepsy Through the Lifetime. *Epilepsia* **1992**, *33*, 49-61.

(224) Bertrand, P. P.; Galligan, J. J.: Alfaxalone, pentobarbital and diazepam potentiate gamma-aminobutyric acid-induced depolarizations in single myenteric neurons of guinea pig intestine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1992**, *262*, 677-682.

(225) Kokate, T. G.; Svensson, B. E.; Rogawski, M. A.: Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1994**, *270*, 1223-1229.

(226) Frye, C. A.: The neurosteroid 3α , 5α -THP has antiseizure and possible neuroprotective effects in an animal model of epilepsy. *Brain Research* **1995**, *696*, 113-120.

(227) Marx, C. E.; Duncan, G. E.; Gilmore, J. H.; Lieberman, J. A.; Morrow, A. L.: Olanzapine increases allopregnanolone in the rat cerebral cortex. *Biological Psychiatry* **2000**, *47*, 1000-1004.

(228) Barbaccia, M. L.; Affricano, D.; Purdy, R. H.; Maciocco, E.; Spiga, F.; Biggio, G.: Clozapine, but not Haloperidol, Increases Brain Concentrations of Neuroactive Steroids in the Rat. *Neuropsychopharmacology* **2001**, *25*, 489-497.

(229) Marx, C. E.; VanDoren, M. J.; Duncan, G. E.; Lieberman, J. A.; Leslie Morrow, A.: Olanzapine and Clozapine Increase the GABAergic Neuroactive Steroid Allopregnanolone in Rodents. *Neuropsychopharmacology* **2003**, *28*, 1-13.

(230) Nechmad, A.; Maayan, R.; Ramadan, E.; Morad, O.; Poyurovsky, M.; Weizman, A.: Clozapine decreases rat brain dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate levels. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* **2003**, *13*, 29-31.

(231) Harris, D. S.; Wolkowitz, O. M.; Reus, V. I.: Movement disorder, memory, psychiatric symptoms and serum DHEA levels in schizophrenic and schizoaffective patients. *World Journal of Biological Psychiatry* **2001**, *2*, 99-102.

(232) Strous, R. D.; Maayan, R.; Lapidus, R.; Stryjer, R.; Lustig, M.; Kotler, M.; Weizman, A.: Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxiety symptoms in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* **2003**, *60*, 133-141.

(233) Romeo, E.; Strohle, A.; Spalletta, G.; Michele, F. d.; Hermann, B.; Holsboer, F.; Pasini, A.; Rupprecht, R.: Effects of antidepressant treatment on neuroactive steroids in major depression. *The American Journal of Psychiatry* **1998**, *155*, 910-913.

(234) Uzunova, V.; Sheline, Y.; Davis, J. M.; Rasmusson, A.; Uzunov, D. P.; Costa, E.; Guidotti, A.: Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 3239-3244.

(235) Butterfield, M. I.; Stechuchak, K. M.; Connor, K. M.; Davidson, J. R. T.; Wang, C.; MacKuen, C. L.; Pearlstein, A. M.; Marx, C. E.: Neuroactive steroids and suicidality in posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry* **2005**, *162*, 380-382.

(236) Rojo, A.; Aguilar, M.; Garolera, M. T.; Cubo, E.; Navas, I.; Quintana, S.: Depression in Parkinson's disease: clinical correlates and outcome. *Parkinsonism & related disorders* **2003**, *10*, 23-28.

(237) Rapkin, A. J.; Morgan, M.; Goldman, L.; Brann, D. W.; Simone, D.; Mahesh, V. B.: Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Obstetrics & Gynecology* **1997**, *90*, 709-714.

(238) Bičíková, M.; Dibbelt, L.; Hiill, M.; Hampl, R.; Stárka, L.: Allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Hormone and Metabolic Research* **1998**, *30*, 227,229.

(239) Monteleone, P.; Luisi, S.; Tonetti, A.; Bernardi, F.; Genazzani, A.; Luisi, M.; Petraglia, F.; Genazzani, A.: Allopregnanolone concentrations and premenstrual syndrome. *European Journal of Endocrinology* **2000**, *142*, 269-273.

(240) Luisi, S.; Petraglia, F.; Benedetto, C.; Nappi, R. E.; Bernardi, F.; Fadalti, M.; Reis, F. M.; Luisi, M.; Genazzani, A. R.: Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2000**, *85*, 2429-2433.

(241) Ibanez, C.; Shields, S. A.; El-Etr, M.; Leonelli, E.; Magnaghi, V.; Li, W. W.; Sim, F. J.; Baulieu, E. E.; Melcangi, R. C.; Schumacher, M.; Franklin, R. J. M.: Steroids and the reversal of age-associated changes in myelination and remyelination. *Progress in Neurobiology* **2003**, *71*, 49-56.

(242) Schumacher, M.; Guennoun, R.; Robert, F.; Carelli, C.; Gago, N.; Ghoumari, A.; Gonzalez Deniselle, M. C.; Gonzalez, S. L.; Ibanez, C.; Labombarda, F.; Coirini, H.; Baulieu, E. E.; De Nicola, A. F.: Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **2004**, *14 Suppl A*, S18-33.

(243) Schumacher, M.; Guennoun, R.; Ghoumari, A.; Massaad, C.; Robert, F.; El-Etr, M.; Akwa, Y.; Rajkowski, K.; Baulieu, E.-E.: Novel Perspectives for Progesterone in Hormone Replacement Therapy, with Special Reference to the Nervous System. *Endocrine Reviews* **2007**, *28*, 387-439.

(244) Baulieu, E.-E.; Schumacher, M.: Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* **2000**, *65*, 605-612.

(245) Ghoumari, A. M.; Baulieu, E. E.; Schumacher, M.: Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience* **2005**, *135*, 47-58.

(246) Bologa, L.; Sharma, J.; Roberts, E.: Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Research* **1987**, *17*, 225-234.

(247) Hajszan, T.; MacLusky, N. J.; Leranth, C.: Dehydroepiandrosterone Increases Hippocampal Spine Synapse Density in Ovariectomized Female Rats. *Endocrinology* **2004**, *145*, 1042-1045.

(248) MacLusky, N. J.; Hajszan, T.; Leranth, C.: Effects of dehydroepiandrosterone and futamide on hippocampal CA1 spine synapse density in male and female rats: implications for the role of androgens in maintenance of hippocampal Structure. *Endocrinology* **2004**, *145*, 4154-4161.

(249) Brinton, R.: The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* **1994**, *14*, 2763-2774.

(250) Suzuki, M.; Wright, L. S.; Marwah, P.; Lardy, H. A.; Svendsen, C. N.: Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 3202-3207.

(251) Lazaridis, I.; Charalampopoulos, I.; Alexaki, I.; Avlonitis, N.; Pediaditakis, I.; Efstathopoulos, P.; Calogeropoulou, T.; Castanas, E.; Gravanis, A.: Neurosteroid Dehydroepiandrosterone Interacts with Nerve Growth Factor (NGF) Receptors, Preventing Neuronal Apoptosis. *Public Library of Science Biology* **2011**, *9*, in press.

(252) Wang, J. M.; Johnston, P. B.; Ball, B. G.; Brinton, R. D.: The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *The Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, 4706-4718.

(253) Wang, J. M.; Liu, L.; Irwin, R. W.; Chen, S.; Brinton, R. D.: Regenerative potential of allopregnanolone. *Brain Research Reviews* **2008**, *57*, 398-409.

(254) Langmade, S. J.; Gale, S. E.; Frolov, A.; Mohri, I.; Suzuki, K.; Mellon, S. H.; Walkley, S. U.; Covey, D. F.; Schaffer, J. E.; Ory, D. S.: Pregnane X receptor (PXR) activation: a mechanism for neuroprotection in a mouse model of Niemann–Pick C disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 13807-13812.

(255) Brinton, R. D.; Wang, J. M.: Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Current Alzheimer Research* **2006**, *3*, 185-190.

(256) Chan, J. R.; Phillips, L. J.; Glaser, M.: Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 10459-10464.

(257) Jung-Testas, I.; Schumacher, M.; Robel, P.; Baulieu, E. E.: The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin proteins (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cellular and Molecular Neurobiology* **1996**, *16*, 439-443.

(258) Zhang, S.-C.: Defining glial cells during CNS development. *Nature Reviews Neuroscience* **2001**, *2*, 840-843.

(259) Clarke, P. G. H.: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology* **1990**, *181*, 195-213.

(260) Saunders, J. W.: Death in embryonic systems. *Science* **1966**, *154*, 604-612.

(261) Glücksmann, A.: Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **1951**, *26*, 59-86.

(262) Taglialatela, G.; Gegg, M.; Perez-Polo, J. R.; Williams, L. R.; Rose, G. M.: Evidence for DNA fragmentation in the CNS of aged Fischer-344 rats. *NeuroReport* **1996**, *7*, 977-980.

(263) Kaufmann, J. A.; Bickford, P. C.; Taglialatela, G.: Oxidative-stress-dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. *Journal of Neurochemistry* **2001**, *76*, 1099-1108.

(264) Lossi, L.; Gambino, G.; Mioletti, S.; Merighi, A.: In vivo analysis reveals different apoptotic pathways in pre- and postmigratory cerebellar granule cells of rabbit. *Journal of Neurobiology* **2004**, *60*, 437-452.

(265) Yuan, J.; Yankner, B. A.: Apoptosis in the nervous system. *Nature* **2000**, *407*, 802-809.

(266) Vajda, F. J. E.: Neuroprotection and neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Neuroscience* **2002**, *9*, 4-8.

(267) Jellinger, K. A.: General aspects of neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission Supplement* **2003**, *65*, 101-144.

(268) Hengartner, M. O.: Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* **2001**, *104*, 325-328.

(269) Hengartner, M. O.: Cell death. In *C. elegans Part II*; Riddle D., B. T., Meyer B., Priess J., Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1997; pp 383-415.

(270) Reed, J. C.: Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology* **2000**, *157*, 1415-1430.

(271) Holcik, M.; Korneluk, R. G.: XIAP, the guardian angel. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**, *2*, 550-556.

(272) Adams, J. M.; Cory, S.: Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* **2002**, *14*, 715-720.

(273) Qin, H.; Srinivasula, S. M.; Wu, G.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E. S.; Shi, Y.: Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* **1999**, *399*, 549-557.

(274) Pop, C.; Timmer, J.; Sperandio, S.; Salvesen, G. S.: The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular cell* **2006**, *22*, 269-275.

(275) Hengartner, M. O.: The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**, *407*, 770-776.

(276) Zimmermann, K. C.; Bonzon, C.; Green, D. R.: The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics* **2001**, *92*, 57-70.

(277) Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X.: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **1998**, *94*, 481-490.

(278) Reed, J. C.: Cytochrome c: Can't live with it – Can't live without it. *Cell* **1997**, *91*, 559-562.

(279) Kroemer, G.; Reed, J. C.: Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* **2000**, *6*, 513-519.

(280) Reed, J. C.: Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **1998**, *17*, 3225-3236.

(281) Wang, H. G.; Pathan, N.; Ethell, I. M.; Krajewski, S.; Yamaguchi, Y.; Shibasaki, F.; McKeon, F.; Bobo, T.; Franke, T. F.; Reed, J. C.: Ca2+-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **1999**, *284*, 339-343.

(282) Kermer, P.; Liman, J.; Weishaupt, J. H.; Bähr, M.: Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neurodegenerative Diseases* **2004**, *1*, 9-19.

(283) Roth, W.; Kermer, P.; Krajewska, M.; Welsh, K.; Davis, S.; Krajewski, S.; Reed, J. C.: Bifunctional apoptosis inhibitor (BAR) protects neurons from diverse cell death pathways. *Cell Death and Differentiation* **2003**, *10*, 1178-1187.

(284) Xu, Q.; Reed, J. C.: Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molecular cell* **1998**, *1*, 337-346.

(285) Schmits, R.; Cochlovius, B.; Treitz, G.; Regitz, E.; Ketter, R.; Preuss, K.-D.; Romeike, B. F. M.; Pfreundschuh, M.: Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *International Journal of Cancer* **2002**, *98*, 73-77.

(286) Blatt, N. B.; Glick, G. D.: Signaling pathways and effector mechanisms preprogrammed cell death. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9*, 1371-1384.

(287) Raoul, C.; Henderson, C. E.; Pettmann, B.: Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *Journal of Cell Biology* **1999**, *147*, 1049-1062.

(288) Liepinsh, E.; Ilag, L. L.; Otting, G.; Ibanez, C. F.: NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 4999-5005.

(289) Bredesen, D. E.; Ye, X.; Tasinato, A.; Sperandio, S.; Wang, J. J.; Assa-Munt, N.; Rabizadeh, S.: p75^{NTR} and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die. *Cell Death and Differentiation* **1998**, *5*, 365-371.

(290) Bredesen, D. E.; Rabizadeh, S.: p75^{NTR} and apoptosis: Trk-dependent and Trkindependent effects. *Trends in Neurosciences* **1997**, *20*, 287-291.

(291) Hu, B.; Yip, H. K.; So, K.-F.: Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: an immunocytochemical study at light and electron microscopic levels. *Glia* **1998**, *24*, 187-197.

(292) Hirsch, S.; Labes, M.; Bahr, M.: Changes in BDNF and neurotrophin receptor expression in degenerating and regenerating rat retinal ganglion cells. *Restorative Neurology and Neuroscience* **2000**, *17*, 125-134.

(293) Johnstone, R. W.: Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1*, 287-299.

(294) Kluck, R. M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D.: The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **1997**, *275*, 1132-1136.

(295) Igney, F. H.; Krammer, P. H.: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 277-288.

(296) Daugas, E.; Susin, S. A.; Zamzami, N.; Ferri, K. F.; Irinopolou, T.; Larochette, N.; Prevost, M.-C.; Leber, B.; Anadrews, D.; Penninger, J.; Kroemer, G.: Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *The FASEB Journal* **2000**, *14*, 729-739.

(297) Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X.: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome C dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **2000**, *102*, 33-42.

(298) Verhagen, A. M.; Ekert, P. G.; Pakusch, M.; Silke, J.; Connolly, L. M.; Reid, G. E.; Moritz, R. L.; Simpson, R. J.; Vaux, D. L.: Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* **2000**, *102*, 43-53.

(299) Choi, D. W.: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in Neurosciences* **1988**, *11*, 465-469.

(300) Murphy, T. H.; Miyamoto, M.; Sastre, A.; Schnaar, R. L.; Coyle, J. T.: Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* **1989**, *2*, 1547-1558.

(301) Murphy, T. H.; Malouf, A. T.; Sastre, A.; Schnaar, R. L.; Coyle, J. T.: Calciumdependent glutamate cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Research* **1988**, 444, 325-332. (302) Alexi, T.; Borlongan, C. V.; Faull, R. L. M.; Williams, C. E.; Clark, R. G.; Gluckman, P. D.; Hughes, P. E.: Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology* **2000**, *60*, 409-470.

(303) Mattson, M. P.: Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2000**, *1*, 120-130.

(304) Mehler, M. F.; Gokhan, S.: Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat. *Trends in Neurosciences* **2000**, *23*, 599-605.

(305) Hughes, R. E.; Olson, J. M.: Therapeutic opportunities in polyglutamine disease. *Nature Medicine* **2001**, *7*, 419-423.

(306) Graeber, M. B.; Moran, L. B.: Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathology* **2002**, *12*, 385-390.

(307) Krantic, S.; Mechawar, N.; Reix, S.; Quirion, R.: Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* **2005**, *28*, 670-676.

(308) Kurata, K.; Takebayashi, M.; Morinobu, S.; Yamawaki, S.: *B*-Estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *311*, 237-245.

(309) Kimonides, V. G.; Khatibi, N. H.; Svendsen, C. N.; Sofroniew, M. V.; Herbert, J.: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 1852-1857.

(310) Lockhart, E. M.; Warner, D. S.; Pearlstein, R. D.; Penning, D. H.; Mehrabani, S.; Boustany, R.-M.: Allopregnanolone attenuates *N*-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture. *Neuroscience Letters* **2002**, *328*, 33-36.

(311) Lapchak, P. A.: The neuroactive steroid $3-\alpha$ -ol- $5-\beta$ -pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Research* **2004**, *997*, 152-158.

(312) Waters, S. L.; Miller, G. W.; Aleo, M. D.; Schnellmann, R. G.: Neurosteroid inhibition of cell death. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **1997**, *273*, F869-F876.

(313) Xilouri, M.; Papazafiri, P.: Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons. *European Journal of Neuroscience* **2006**, *23*, 43-54.

(314) Charalampopoulos, I.; Tsatsanis, C.; Dermitzaki, E.; Alexaki, V.-I.; Castanas, E.; Margioris, A. N.; Gravanis, A.: Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 8209-8214.

(315) Charalampopoulos, I.; Alexaki, V.-I.; Lazaridis, I.; Dermitzaki, E.; Avlonitis, N.; Tsatsanis, C.; Calogeropoulou, T.; Margioris, A. N.; Castanas, E.; Gravanis, A.: G proteinassociated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *The FASEB Journal* **2006**, *20*, 577-579.

(316) Djebaili, M.; Guo, Q.; Pettus, E. H.; Hoffman, S. W.; Stein, D. G.: The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma* **2005**, *22*, 106-118.

(317) Swaab, D. F.; Raadsheer, F. C.; Endert, E.; Hofman, M. A.; Kamphorst, W.; Ravid, R.: Increased cortisol levels in aging and Alzheimer's disease in postmortem cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroendocrinology* **1994**, *6*, 681-687.

(318) Umegaki, H.; Ikari, H.; Nakahata, H.; Endo, H.; Suzuki, Y.; Ogawa, O.; Nakamura, A.; Yamamoto, T.; Iguchi, A.: Plasma cortisol levels in elderly female subjects with Alzheimer's disease: a cross-sectional and longitudinal study. *Brain Research* **2000**, *881*, 241-243.

(319) Banday, A. H.; Mir, B. P.; Lone, I. H.; Suri, K. A.; Kumar, H. M. S.: Studies on novel D-ring substituted steroidal pyrazolines as potential anticancer agents. *Steroids* **2010**, *75*, 805-809.

(320) Banday, A. H.; Shameem, S. A.; Gupta, B. D.; Kumar, H. M. S.: D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *Steroids* **2010**, *75*, 801-804.

(321) Corey, E. J.; Venkateswarlu, A.: Protection of hydroxyl groups as tertbutyldimethylsilyl derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 6190-6191.

(322) Hanessian, S.; Lavallee, P.: The Preparation and Synthetic Utility of tert-Butyldiphenylsilyl Ethers. *Canadian Journal of Chemistry* **1975**, *53*, 2975-2977.

(323) Hart, T. W.; Metcalfe, D. A.; Scheinmann, F.: Total synthesis of (+/-)-prostagladin D1: use of triethylsilyl protecting groups. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1979**, 156-157.

(324) Auburn, P. R.; Mackenzie, P. B.; Bosnich, B.: Asymmetric synthesis. Asymmetric catalytic allylation using palladium chiral phosphine complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 2033-2046.

(325) Singh, J.; Satyamurthi, N.; Aidhen, I. S.: The Growing Synthetic Utility of Weinreb's Amide. *Journal für praktische Chemie* **2000**, *342*, 340-347.

(326) Ricci, A.; Degl'innocenti, A.; Fiorenza, M.; Taddei, M.; Spartera, M. A.; Walton, D. R. M.: Fluoride ion induced reactions of organosilanes with electrophiles. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*, 577-578.

(327) Maksay, G.; Fodor, L.; Bíró, T.; Avlonitis, N.; Calogeropoulou, T.: A 17β derivative of allopregnanolone is a neurosteroid antagonist at a cerebellar subpopulation of GABA_A receptors with nanomolar affinity. *British Journal of Pharmacology* **2007**, *151*, 1078-1086.

(328) Calogeropoulou, T.; Avlonitis, N.; Minas, V.; Alexi, X.; Pantzou, A.; Charalampopoulos, I.; Zervou, M.; Vergou, V.; Katsanou, E. S.; Lazaridis, I.; Alexis, M. N.; Gravanis, A.: Novel Dehydroepiandrosterone Derivatives with Antiapoptotic, Neuroprotective Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 6569-6587.

(329) Castanas, E.; Gravanis, A.; Calogeropoulou, T.; Margioris, A.; Charalambopoulos, I.; Avlonitis, N.; Minas, V.; Alexaki, V.-I.; Tsatsanis, C.; Alexis, M. N.; Remboutsika, E.; Vergou, V.; Neophytou, C.: Neurosteroid compounds. Office, E. P., Ed.: Europe, 2008; Vol. WO 2008155534 (A2).

(330) Corey, E. J.; Chaykovsky, M.: Dimethylsulfonium Methylide, a Reagent for Selective Oxirane Synthesis from Aldehydes and Ketones. *Journal of the American Chemical Society* **1962**, *84*, 3782-3783.

(331) Anderson, A.; Boyd, A. C.; Clark, J. K.; Fielding, L.; Gemmell, D. K.; Hamilton, N. M.; Maidment, M. S.; May, V.; McGuire, R.; McPhail, P.; Sansbury, F. H.; Sundaram, H.; Taylor, R.: Conformationally Constrained Anesthetic Steroids That Modulate GABAA Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 4118-4125.

(332) Hatano, M.; Suzuki, S.; Ishihara, K.: Highly Efficient Alkylation to Ketones and Aldimines with Grignard Reagents Catalyzed by Zinc(II) Chloride. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 9998-9999.

(333) Imamoto, T.; Takiyama, N.; Nakamura, K.: Cerium chloride-promoted nucleophilic addition of grignard reagents to ketones an efficient method for the synthesis of tertiary alcohols. *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 4763-4766.

(334) Imamoto, T.; Takiyama, N.; Nakamura, K.; Hatajima, T.; Kamiya, Y.: Reactions of carbonyl compounds with Grignard reagents in the presence of cerium chloride. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 4392-4398.

(335) Li, X.; Singh, S. M.; Labrie, F.: Highly efficient nucleophilic addition of alkyl Grignard reagents to 17-ketosteroids in the presence of cerium(III) chloride: Synthesis of 17[alpha]-propyl-17[beta]-hydroxy-4-androsten-3-one, an androgen receptor antagonist. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 1157-1160.

(336) Litvinovskaya, R. P.; Drach, S. V.; Lapchinskaya, Y. I.; Khripach, V. A.: Synthesis of 17-Dihydroisoxazolyl Steroids of the Androstane and Estrone Series. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2001**, *37*, 46-51.

(337) Gill, J. C.; Lockey, P. M.; Marples, B. A.; Traynor, J. R.: 3,17.beta.-dihydroxy-20,21-epoxy-19-norpregna-1,3,5(10)-trienes. Synthesis, rearrangement, cytotoxicity, and estrogen-receptor binding. *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, *29*, 1537-1540.

(338) Takano, S.; Yamada, S. i.; Numata, H.; Ogasawara, K.: A new synthesis of a steroid side chain via stereocontrolled protonation: synthesis of (-)-desmosterol. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1983**, 760-761.

(339) Nes, W. R.; Varkey, T. E.; Crump, D. R.; Gut, M.: (Z)-17(20)-Dehydrocholesterol. A new sterol with C-21 and C-22 spatially fixed. *The Journal of Organic Chemistry* **1976**, *41*, 3429-3433.

(340) Parker, K. A.; Kosley Jr., R. W.: Process for the preparation of 17(20)ene-21steroid aldehydes. U.S.A., 1977; Vol. US4059575.

(341) Girard, P.; Kagan, H. B.: Lanthanide reagents in organic chemistry. A convenient catalytic oxidatiom of benzoins to benzils using lanthanum nitrates. *Tetrahedron Letters* **1975**, *16*, 4513-4514.

(342) Luche, J. L.: Lanthanides in organic chemistry. 1. Selective 1,2 reductions of conjugated ketones. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 2226-2227.

(343) Sakee, U.; Kongkathip, B.; Kongkathip, N.: Efficient synthesis of 16α-methyl cyproterone acetate. *Journal of Chemical Research, Synopses* **2003**, *1*, 12-13.

(344) Toró, A.; Ambrus, G.: Synthesis of 17[alpha]-hydroxy-20-oxo-pregnanes from 17(20)-dehydro-23,24-dinorcholan-22-oic acids. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 5265-5266.

(345) Gassman, P. G.; Schenk, W. N.: A general procedure for the base-promoted hydrolysis of hindered esters at ambient temperatures. *The Journal of Organic Chemistry* **1977**, *42*, 918-920.

(346) Nicolaou, K. C.; Webber, S. E.: Stereocontrolled Total Synthesis of Lipoxins B. *Synthesis* **1986**, 453-461.

(347) Bartoszewicz, A.; Kalek, M.; Nilsson, J.; Hiresova, R.; Stawinski, J.: A New Reagent System for Efficient Silylation of Alcohols: Silyl Chloride-N-Methylimidazole-Iodine. *Synlett* **2008**, 37-40.

(348) Horwell, D. C.; Lennon, I. C.; Roberts, E.: A facile method to append peptidal side-chains onto steroidal templates. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4225-4234.

(349) Pettit, G. R.; Dias, J. R.: Bufadienolides. 13. Conversion of 3.beta.-hydroxy-17-oxoandrost-5-ene to 3.beta.-acetoxy-5.beta.,14.alpha.-bufa-20,22-dienolide. *The Journal of Organic Chemistry* **1971**, *36*, 3207-3211.

(350) Ponce, M. A.; Erra-Balsells, R.; Bruttomesso, A. C.; Gros, E. G.: Photooxygenation of Pregnanes. *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 2987-3003.

(351) Riveiros, R.; Rumbo, A.; Sarandeses, L. A.; Mouriño, A.: Synthesis and Conformational Analysis of 17α ,21-Cyclo-22-Unsaturated Analogues of Calcitriol⁺. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 5477-5485.

(352) Theberge, C. R.; Verbicky, C. A.; Zercher, C. K.: Studies on the Diastereoselective Preparation of Bis-cyclopropanes. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 8792-8798.

(353) Thompson, S. K.; Heathcock, C. H.: Total synthesis of some marasmane and lactarane sesquiterpenes. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 5979-5989.

(354) Duvold, T.; Jørgensen, A.; Andersen, N. R.; Henriksen, A. S.; Dahl Sørensen, M.; Björkling, F.: 17S,20S-Methanofusidic acid, a new potent semi-synthetic fusidane antibiotic. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 3569-3572.

(355) Gholapa, A. R.; Paula, V.; Srinivasana, K. V.: Novel Process for the Synthesis of Class I Antiarrhythmic Agent (±)-Cibenzoline and Its Analogs. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* **2008**, *38*, 2967-2982.

(356) Simmons, H. E.; Smith, R. D.: A new synthesis of cyclopropanes from olefins. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80*, 5323-5324.

(357) Donaldson, W. A.: Synthesis of cyclopropane containing natural products. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8589-8627.

(358) Charette, A. B.; Lebel, H.: Diastereoselective Cyclopropanation of Chiral Allylic Alcohols: A More Efficient Reagent for the Relative Stereocontrol. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 2966-2967.

(359) Felzmann, W.; Gmeiner, G.; Gärtner, P.: First synthesis of a pentadeuterated 3'-hydroxystanozolol--an internal standard in doping analysis. *Steroids* **2005**, *70*, 103-110.

(360) Grubbs, R. H.; Miller, S. J.; Fu, G. C.: Ring-Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28*, 446-452.

(361) Grubbs, R. H.; Chang, S.: Recent advances in olefin metathesis and its application in organic synthesis. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413-4450.

(362) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D.: Metathesis Reactions in Total Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 4490-4527.

(363) Gradillas, A.; Pérez-Castells, J.: Macrocyclization by Ring-Closing Metathesis in the Total Synthesis of Natural Products: Reaction Conditions and Limitations. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 6086-6101.

(364) Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A. R.: The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction. *Nature* **2007**, *450*, 243-251.

(365) Sturino, C. F.; Wong, J. C. Y.: The ring-closing metathesis of vinyl ethers with Grubbs' catalyst for the synthesis of dihydropyrans. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 9623-9626.

(366) Schmidt, B.; Wildemann, H.: Single and double ring closing metathesis in the formation of dihydropyrans and bisoxacyclic systems with a quaternary centre. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1 **2000**, 2916-2925.

(367) Schmidt, B.; Wildemann, H.: A Synthesis of Densely Functionalized 2,3-Dihydropyrans Using Ring-Closing Metathesis and Base-Induced Rearrangements of Dihydropyran Oxides. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 3145-3163.

(368) Schmidt, B.: An Olefin Metathesis/Double Bond Isomerization Sequence Catalyzed by an In Situ Generated Ruthenium Hydride Species. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 816-819.

(369) Diver, S. T.; Giessert, A. J.: Enyne Metathesis (Enyne Bond Reorganization). *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 1317-1382.

(370) Trost, B.: The atom economy--a search for synthetic efficiency. *Science* **1991**, *254*, 1471-1477.

(371) Grubbs, R. H.: *Handbook of Metathesis: Catalyst Development*; WILEY-VCH: Weinheim, 2003.

(372) Wiberg, K. B.: The Concept of Strain in Organic Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25*, 312-322.

(373) Conrad, J. C.; Eelman, M. D.; Silva, J. A. D.; Monfette, S.; Parnas, H. H.; Snelgrove, J. L.; Fogg, D. E.: Oligomers as Intermediates in Ring-Closing Metathesis. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 1024-1025.

(374) Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H.: Molybdenum and Tungsten Imido Alkylidene Complexes as Efficient Olefin-Metathesis Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 4592-4633.

(375) Slinn, C. A.; Redgrave, A. J.; Lucy Hind, S.; Edlin, C.; Nolan, S. P.; Gouverneur, V.: Synthesis of unprotected and borane-protected cyclic phosphines using Ru- and Mobased olefin metathesis catalysts. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 3820-3825.

(376) Cortez, G. A.; Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H.: Efficient Enantioselective Synthesis of Piperidines through Catalytic Asymmetric Ring-Opening/Cross-Metathesis Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 4534-4538.

(377) Scholl, M.; Trnka, T. M.; Morgan, J. P.; Grubbs, R. H.: Increased ring closing metathesis activity of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with imidazolin-2-ylidene ligands. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 2247-2250.

(378) Jean-Louis Hérisson, P.; Chauvin, Y.: Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène. II. Télomérisation des oléfines cycliques en présence d'oléfines acycliques. *Die Makromolekulare Chemie* **1971**, *141*, 161-176.

(379) Tallarico, J. A.; Bonitatebus, P. J.; Snapper, M. L.: Ring-Opening Metathesis. A Ruthenium Catalyst Caught in the Act. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 7157-7158.

(380) McGuinness, D. S.; Cavell, K. J.; Skelton, B. W.; White, A. H.: Zerovalent Palladium and Nickel Complexes of Heterocyclic Carbenes: Oxidative Addition of Organic Halides, Carbon–Carbon Coupling Processes, and the Heck Reaction. *Organometallics* **1999**, *18*, 1596-1605.

(381) Sanford, M. S.; Love, J. A.; Grubbs, R. H.: Mechanism and Activity of Ruthenium Olefin Metathesis Catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6543-6554.

(382) Anderson, D. R.; Hickstein, D. D.; O'Leary, D. J.; Grubbs, R. H.: Model Compounds of Ruthenium–Alkene Intermediates in Olefin Metathesis Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 8386-8387.

(383) Poater, A.; Solans-Monfort, X.; Clot, E.; Copéret, C.; Eisenstein, O.: Understanding d0-Olefin Metathesis Catalysts: Which Metal, Which Ligands? *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 8207-8216.

(384) Tsang, W. C. P.; Hultzsch, K. C.; Alexander, J. B.; Bonitatebus, P. J.; Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H.: Alkylidene and Metalacyclic Complexes of Tungsten that Contain a Chiral Biphenoxide Ligand. Synthesis, Asymmetric Ring-Closing Metathesis, and Mechanistic Investigations. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 2652-2666.

(385) Romero, P. E.; Piers, W. E.: Direct Observation of a 14-Electron Ruthenacyclobutane Relevant to Olefin Metathesis. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 5032-5033.

(386) Adlhart, C.; Chen, P.: Mechanism and Activity of Ruthenium Olefin Metathesis Catalysts: The Role of Ligands and Substrates from a Theoretical Perspective. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 3496-3510.

(387) El Garrouj, D.; Aumelas, A.; Borgna, J. L.: Steroidal affinity labels of the estrogen receptor. 1. 17.alpha.-(Bromoacetoxy)alkyl/alkynylestradiols. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, *36*, 2973-2983.

(388) Auger, S.; Luu-The, V.; Sam, K. M.; Poirier, D.: 3-Hydroxy-19-nor-17[alpha]pregna-1,3,5(10)-triene-21,17[beta]-carbolactone as inhibitor of 17[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 2045-2048. (389) Sam, K. M.; Auger, S.; Luu-The, V.; Poirier, D.: Steroidal Spiro-.gamma.lactones That Inhibit 17.beta.-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Human Placental Microsomes. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 4518-4528.

(390) Patra, D.; Ghosh, S.: Regioselectivity and Stereospecificity in a Contrastereoelectronically Controlled Pinacol Rearrangement of Alkoxycyclobutane Derivatives. A Novel Route to Vicinally Substituted Cyclopentanones. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 2526-2531.

(391) Zhang, S.; Zhen, J.; Reith, M. E. A.; Dutta, A. K.: Discovery of Novel Trisubstituted Asymmetric Derivatives of (2S,4R,5R)-2-benzhydryl-5-benzylaminotetrahydropyran-4-ol, Exhibiting High Affinity for Serotonin and Norepinephrine Transporters in a Stereospecific Manner. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 4962-4971.

(392) Nelson, S. G.; Bungard, C. J.; Wang, K.: Catalyzed Olefin Isomerization Leading to Highly Stereoselective Claisen Rearrangements of Aliphatic Allyl Vinyl Ethers. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13000-13001.

(393) Schmidt, B.: Ruthenium-Catalyzed Olefin Metathesis Double-Bond Isomerization Sequence. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 7672-7687.

(394) Katz, T. J.; Sivavec, T. M.: Metal-catalyzed rearrangement of alkene-alkynes and the stereochemistry of metallacyclobutene ring opening. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 737-738.

(395) Kinoshita, A.; Mori, M.: Ruthenium Catalyzed Enyne Metathesis. *Synlett* **1994**, 1020-1022.

(396) Mori, M.: Enyne Metathesis. In *Topics in Organometallic Chemistry*

Springer, 1998; Vol. 1; pp 133-154.

(397) Poulsen, C. S.; Madsen, R.: Enyne Metathesis Catalyzed by Ruthenium Carbene Complexes. *Synthesis* **2003**, *1*, 1-18.

(398) Trost, B. M.: On Inventing Reactions for Atom Economy. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35*, 695-705.

(399) Kim, S.-H.; Bowden, N.; Grubbs, R. H.: Catalytic Ring Closing Metathesis of Dienynes: Construction of Fused Bicyclic Rings. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 10801-10802.

(400) Rodríguez, J. R.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L.: Synthesis of Eight- and Nine-Membered Carbocycles through a Ring-Closing Metathesis/Ring Fragmentation Strategy: A Rapid and Versatile Approach to Bicyclo[6.4.0]- and Bicyclo[7.4.0]alkene Ring Systems. *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8*, 2923-2930.

(401) Neipp, C. E.; Martin, S. F.: Synthesis of Bridged Azabicyclic Structures via Ring-Closing Olefin Metathesis. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 8867-8878.

(402) Trost, B. M.; Tanoury, G. J.: An unusual mechanism of a palladium-catalyzed intramolecular carbametalation. A novel palladium-catalyzed rearrangement. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 1636-1638.

(403) Trost, B. M.; Chang, V. K.: An Approach to Botrydianes: On the Steric Demands of a Metal Catalyzed Enyne Metathesis. *Synthesis* **1993**, 824-832.

(404) Trost, B. M.; Krische, M. J.: Transition Metal Catalyzed Cycloisomerizations. *Synlett* **1998**, 1-16.

(405) Aubert, C.; Buisine, O.; Malacria, M.: The Behavior of 1,n-Enynes in the Presence of Transition Metals. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 813-834.

(406) Chatani, N.; Inoue, H.; Kotsuma, T.; Murai, S.: Skeletal Reorganization of Enynes to 1-Vinylcycloalkenes Catalyzed by GaCl3. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10294-10295.

(407) Hansen, E. C.; Lee, D.: Enyne Metathesis for the Formation of Macrocyclic 1,3-Dienes. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 9582-9583.

(408) Hansen, E. C.; Lee, D.: Ring Closing Enyne Metathesis: Control over Mode Selectivity and Stereoselectivity. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15074-15080.

(409) Mori, M.; Kitamura, T.; Sato, Y.: Synthesis of Medium-Sized Ring Compounds Using Enyne Metathesis. *Synthesis* **2001**, 654-664.

(410) Layton, M. E.; Morales, C. A.; Shair, M. D.: Biomimetic Synthesis of (–)-Longithorone A. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 773-775.

(411) Barrett, A. G. M.; Hennessy, A. J.; Vézouët, R. L.; Procopiou, P. A.; Seale, P. W.; Stefaniak, S.; Upton, R. J.; White, A. J. P.; Williams, D. J.: Synthesis of Diverse Macrocyclic Peptidomimetics Utilizing Ring-Closing Metathesis and Solid-Phase Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 1028-1037.

(412) Morales, C. A.; Layton, M. E.; Shair, M. D.: Natural Product Synthesis Special Feature: Synthesis of (-)-longithorone A: Using organic synthesis to probe a proposed biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **2004**, *101*, 12036-12041.

(413) Stragies, R.; Schuster, M.; Blechert, S.: A Crossed Yne–Ene Metathesis Showing Atom Economy. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36*, 2518-2520.

(414) Sezer, S.; Gümrükçü, Y.; Sahin, E.; Tanyeli, C.: Stereoselective synthesis of spirocyclic cyclopentapyrans by the Pauson-Khand reaction on camphor tethered enynes. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2705-2710.

(415) Brahma, S.; Maity, S.; Ray, J. K.: Metathetic approach towards macrocyclic bis-ethers and in sequence use of barbier reaction and RCM for spirocyclic ethers. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2007**, *44*, 29-34.

(416) Wu, H.-J.; Liu, C.-F.; Wang, Z.; Lin, H.-C.: Intramolecular Diels-Alder reaction of 2-diphenylphosphinyl-5-(propargyloxymethyl)furans followed by nucleophilic 1,2-rearrangement of the phosphinyl group. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 6192-6194.

(417) Guo, H.; Madhushaw, R. J.; Shen, F.-M.; Liu, R.-S.: Synthesis of chiral oxacyclic dienes via ruthenium-catalyzed enyne metathesis: useful building blocks for chiral tricyclic oxygen derivatives. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5627-5637.

(418) Rosenfeld, R. S.; Rosenberg, B.; Kream, J.; Hellman, L.: Preparation of some C19 steroid-protein conjugates. *Steroids* **1973**, *21*, 723-733.

(419) Condom, R.; Emiliozzi, R.: I -- preparation of steroid-antigens through positions of the steroid not bearing functional groups. *Steroids* **1974**, *23*, 483-498.

(420) Ehrenstein, M.: Investigations on steroids I. 6-Oxoprogesterone and the stereochemical configuration of several 3,5,6-triols*. *The Journal of Organic Chemistry* **1939**, *4*, 506-518.

(421) Bazin, M.-A.; Travert, C.; Carreau, S.; Rault, S.; Kihel, L. E.: First synthesis of 7[alpha]- and 7[beta]-amino-DHEA, dehydroepiandrosterone (DHEA) analogues and preliminary evaluation of their cytotoxicity on Leydig cells and TM4 Sertoli cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 3152-3160.

(422) Fieser, L. F.: Preparation of Ethylenethioketals. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 1945-1947.

(423) Koutsourea, A. I.; Arsenou, E. S.; Fousteris, M. A.; Nikolaropoulos, S. S.: Synthetic approaches for the synthesis of a cytostatic steroidal B-D bilactam. *Steroids* **2003**, *68*, 659-666.

(424) Salvador, J. A. R.; Silvestre, S. M.: Bismuth-catalyzed allylic oxidation using tbutyl hydroperoxide. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 2581-2584.

(425) Marwah, P.: Process for effecting allylic oxidation using dicarboxylic acid imides and chromium reagents. U.S.A., 2002; Vol. US 6384251 B1.

(426) Pouzar, V.; Cerný, I.; Lapcík, O.; Hill, M.; Hampl, R.: Synthesis of two new haptens of 16[alpha]-hydroxydehydroepiandrosterone (3[beta],16[alpha]-dihydroxyandrost-5-en-17-one). *Steroids* **2003**, *68*, 149-158.

(427) Sheehan, J. C.; Hess, G. P.: A new method of forming peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 1067-1068.

(428) Τζουγκράκη, Χ.; Κόκκοτος, Γ.: *Θέματα Βιοοργανικής Χημείας*; Γκελμπέσης, Γ.: Αθήνα, 2003.

(429) Horoszewicz, J. S.; Leong, S. S.; Kawinski, E.; Karr, J. P.; Rosenthal, H.; Chu, T. M.; Mirand, E. A.; Murphy, G. P.: LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Research* **1983**, *43*, 1809-1818.

(430) Bladou, F.; Gleave, M. E.; Penault-Llorca, F.; Serment, G.; Lange, P. H.; Vessella, R. L.: In vitro and in vivo models developed from human prostatic cancer. *Progrès en Urologie* **1997**, *7*, 384-396.

(431) Lieber, M.; Todaro, G.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W.: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer* **1976**, *17*, 62-70.

(432) Provost, P. R.; Blomquist, C. H.; Godin, C.; Huang, X.-F.; Flamand, N.; Luu-The, V.; Nadeau, D.; Tremblay, Y.: Androgen Formation and Metabolism in the Pulmonary Epithelial Cell Line A549: Expression of 17{beta}-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 5 and 3{alpha}-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3. *Endocrinology* **2000**, *141*, 2786-2794.

(433) Mikkonen, L.; Pihlajamaa, P.; Sahu, B.; Zhang, F.-P.; Jänne, O. A.: Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2010**, *317*, 14-24.

(434) Brooks, S. C.; Locke, E. R.; Soule, H. D.: Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248*, 6251-6253.

(435) Saceda, M.; Lippman, M. E.; Chambon, P.; Lindsey, R. L.; Ponglikitmongkol, M.; Puente, M.; Martin, M. B.: Regulation of the Estrogen Receptor in MCF-7 Cells by Estradiol. *Molecular Endocrinology* **1988**, *2*, 1157-1162.

(436) Lacroix, M.; Leclercq, G.: Relevance of Breast Cancer Cell Lines as Models for Breast Tumours: An Update. *Breast Cancer Research and Treatment* **2004**, *83*, 249-289.

(437) Van Dijk, M. A. J.; Floore, A. N.; Kloppenborg, K. I. M.; van't Veer, L. J.: A Functional Assay in Yeast for the Human Estrogen Receptor Displays Wild-Type and Variant Estrogen Receptor Messenger RNAs Present in Breast Carcinoma. *Cancer Research* **1997**, *57*, 3478-3485.

(438) Levenson, A. S.; Jordan, V. C.: MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research* **1997**, *57*, 3071-3078.

(439) Vichai, V.; Kirtikara, K.: Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 1112-1116.

(440) Hales, T.; Tyndale, R.: Few cell lines with GABAA mRNAs have functional receptors. *The Journal of Neuroscience* **1994**, *14*, 5429-5436.

(441) Saito, Y.; Tsuzuki, K.; Yamada, N.; Okado, H.; Miwa, A.; Goto, F.; Ozawa, S.: Transfer of NMDAR2 cDNAs increases endogenous NMDAR1 protein and induces expression of functional NMDA receptors in PC12 cells. *Molecular Brain Research* **2003**, *110*, 159-168.

(442) Schumacher, M.; Weill-Engerer, S.; Liere, P.; Robert, F.; Franklin, R. J. M.; Garcia-Segura, L. M.; Lambert, J. J.; Mayo, W.; Melcangi, R. C.; Parducz, A.; Suter, U.; Carelli, C.; Baulieu, E. E.; Akwa, Y.: Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in Neurobiology* **2003**, *71*, 3-29.

(443) Charalampopoulos, I.; Dermitzaki, E.; Vardouli, L.; Tsatsanis, C.; Stournaras, C.; Margioris, A. N.; Gravanis, A.: Dehydroepiandrosterone Sulfate and Allopregnanolone Directly Stimulate Catecholamine Production via Induction of Tyrosine Hydroxylase and Secretion by Affecting Actin Polymerization. *Endocrinology* **2005**, *146*, 3309-3318.

(444) Henderson, B. E.; Feigelson, H. S.: Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 427-433.

(445) Chen, W. Y.; Manson, J. E.; Hankinson, S. E.; Rosner, B.; Holmes, M. D.; Willett, W. C.; Colditz, G. A.: Unopposed Estrogen Therapy and the Risk of Invasive Breast Cancer. *Archives of Internal Medicine* **2006**, *166*, 1027-1032.

(446) Takahashi, Y.; Hursting, S. D.; Perkins, S. N.; Wang, T.-C.; Wang, T. T. Y.: Genistein affects and rogen-responsive genes through both and rogen- and estrogen-induced signaling pathways. *Molecular Carcinogenesis* **2006**, *45*, 18-25.

(447) Johnson, S. M.; Maleki-Dizaji, M.; Styles, J. A.; White, I. N. H.: Ishikawa cells exhibit differential gene expression profiles in response to oestradiol or 4-hydroxytamoxifen. *Endocrine-Related Cancer* **2007**, *14*, 337-350.

(448) Guerini, V.; Sau, D.; Scaccianoce, E.; Rusmini, P.; Ciana, P.; Maggi, A.; Martini, P. G. V.; Katzenellenbogen, B. S.; Martini, L.; Motta, M.; Poletti, A.: The Androgen Derivative 5α -Androstane- 3β ,17 β -Diol Inhibits Prostate Cancer Cell Migration Through Activation of the Estrogen Receptor β Subtype. *Cancer Research* **2005**, *65*, 5445-5453.

(449) Kasiotis, K. M.; Mendorou, C.; Haroutounian, S. A.; Alexis, M. N.: High affinity 17[alpha]-substituted estradiol derivatives: Synthesis and evaluation of estrogen receptor agonist activity. *Steroids* **2006**, *71*, 249-255.

(450) Lazennec, G.; Alcorn, J. L.; Katzenellenbogen, B. S.: Adenovirus-Mediated Delivery of a Dominant Negative Estrogen Receptor Gene Abrogates Estrogen-Stimulated Gene Expression and Breast Cancer Cell Proliferation. *Molecular Endocrinology* **1999**, *13*, 969-980.

(451) Fokialakis, N.; Lambrinidis, G.; Mitsiou, D. J.; Aligiannis, N.; Mitakou, S.; Skaltsounis, A.-L.; Pratsinis, H.; Mikros, E.; Alexis, M. N.: A New Class of Phytoestrogens: Evaluation of the Estrogenic Activity of Deoxybenzoins. *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 397-406.

(452) Wittmann, B. M.; Sherk, A.; McDonnell, D. P.: Definition of Functionally Important Mechanistic Differences among Selective Estrogen Receptor Down-regulators. *Cancer Research* **2007**, *67*, 9549-9560.

(453) Skretas, G.; Meligova, A. K.; Villalonga-Barber, C.; Mitsiou, D. J.; Alexis, M. N.; Micha-Screttas, M.; Steele, B. R.; Screttas, C. G.; Wood, D. W.: Engineered Chimeric Enzymes as Tools for Drug Discovery: Generating Reliable Bacterial Screens for the Detection, Discovery, and Assessment of Estrogen Receptor Modulators. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 8443-8457.

(454) Alexi, X.; Kasiotis, K. M.; Fokialakis, N.; Lambrinidis, G.; Meligova, A. K.; Mikros, E.; Haroutounian, S. A.; Alexis, M. N.: Differential estrogen receptor subtype modulators: Assessment of estrogen receptor subtype-binding selectivity and transcription-regulating properties of new cycloalkyl pyrazoles. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2009**, *117*, 159-167.

(455) Nishida, M.: The Ishikawa Cells from Birth to the Present. *Human Cell* **2002**, *15*, 104-117.

(456) Maggiolini, M.; Recchia, A.; Carpino, A.; Vivacqua, A.; Fasanella, G.; Rago, V.; Pezzi, V.; Briand, P.; Picard, D.; Ando, S.: Oestrogen receptor beta is required for androgenstimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **2004**, *32*, 777-791.

(457) He, D.; Falany, C. N.: Inhibition of SULT2B1b expression alters effects of 3β -hydroxysteroids on cell proliferation and steroid hormone receptor expression in human LNCaP prostate cancer cells. *The Prostate* **2007**, *67*, 1318-1329.

(458) Vihko, P.; Herrala, A.; Härkönen, P.; Isomaa, V.; Kaija, H.; Kurkela, R.; Pulkka, A.: Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSDs. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2006**, *248*, 141-148.

(459) Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R.: Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology* **1977**, *36*, 59-72.

(460) Shaw, G.; Morse, S.; Ararat, M.; Graham, F. L.: Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal* **2002**, *16*, 869-871.

(461) Green, P. S.; Gridley, K. E.; Simpkins, J. W.: Nuclear estrogen receptorindependent neuroprotection by estratrienes: a novel interaction with glutathione. *Neuroscience* **1998**, *84*, 7-10.

(462) Liu, J.; Li, L.; Suo, W. Z.: HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sciences* **2009**, *84*, 267-271.

(463) Maher, P.; Davis, J. B.: The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity. *The Journal of Neuroscience* **1996**, *16*, 6394-6401.

(464) Bhacca, N. S.; Fronczek, F. R.; Sygula, A.: Investigations of dehydroepiandrosterone. Part I: crystal structure of sublimed DHEA. *Journal of Chemical Crystallography* **1996**, *26*, 483-487.

(465) Shiau, A. K.; Barstad, D.; Radek, J. T.; Meyers, M. J.; Nettles, K. W.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A.; Agard, D. A.; Greene, G. L.: Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nature Structural Biology* **2002**, *9*, 359-364.

(466) Nettles, K. W.; Bruning, J. B.; Gil, G.; Nowak, J.; Sharma, S. K.; Hahm, J. B.; Kulp, K.; Hochberg, R. B.; Zhou, H.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S.; Kim, Y.; Joachimiak, A.; Greene, G. L.: NFkB selectivity of estrogen receptor ligands revealed by comparative crystallographic analyses. *Nature Chemical Biology* **2008**, *4*, 241-247.