ФАРМАЦИЯ
PHARMACIA

Том/Volume LVII **2010** **Книжка/Number 1-4**

СПИСАНИЕ НА БЪЛГАРСКОТО НАУЧНО ДРУЖЕСТВО ПО ФАРМАЦИЯ

JOURNAL OF THE BULGARIAN PHARMACEUTICAL SCIENTIFIC SOCIETY

Адрес на редакицията
Фармацевтичен факултет
ул.. "Дунав" 2, София 1000
Факс (02) 987 987 4
Гл. редактор: ✆ (02) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

Address of Editorial Board
Faculty of Pharmacy
2, Dunav str., Sofia 1000
Fax (02) 987 987 4
Editor in Chief: ✆(+359 2) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Оригинални статии

Обзори

C O N T E N T S

Original articles

Reviews

ФАРМАЦИЯ 1-4/2010
ISSN 0428-0296 УДК 615

Организационен секретар *Св. Цветанова*
Стилова редакция *Св. Цветанова и д-р Б. Станчева (на англ. ез.)*
Корекция *Св. Цветанова*
Терминологичен и семантичен контрол *д-р Б. Станчева*
Форматиране *О. Маркова*

Подписана за печат на 11.02.2011 г.
Печатни коли 11.5, формат 60 x 90/8

Централна медицинска библиотека
1431 София, ул. „Св. Г. Софийски" № 1, тел. 952-16-45, Fax: 851 82 65
e-mail: svetlamu@mail.bg

ПРИРОДНИ И СИНТЕТИЧНИ ТРИПТАМИНОВИ ПРОИЗВОДНИ С ФИЗИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ

Е. Игов и И. Манолов

Катедра "Фармацевтична химия", Фармацевтичен факултет,
Медицински университет – София

Резюме. Настоящият обзор е фокусиран върху химията и молекулярнобиологичните механизми на действие на няколко триптаминови производни. Избраните вещества са с голямо биологично значение. Серотонинът и мелатонинът са метаболитносвързани неврохормони, регулиращи съня, апетита, гнева и фантазията. Друга група триптаминови производни, на която е обърнато специално внимание, е тази на диметилтриптаминитe. Псилоцинът, псилоцибинът и буфотенинът са халюциногени. Триптаните са синтетични антимигренни средства, използвани в клиничната практика.

Ключови думи: буфотенин, мелатонин, псилоцибин, псилоцин, суматриптан.

NATURAL AND SYNTHETIC TRYPTAMINE DERIVATIVES WITH PHYSIOLOGICAL ACTIVITY

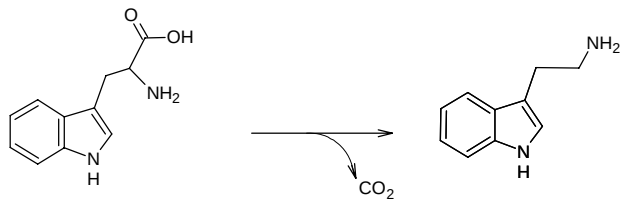
E. Igov and I. Manolov

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University – Sofia

Summary. This review focuses on the chemistry and biomolecular mechanisms of action of several tryptamine derivatives. The substances chosen are of great biological importance. Serotonin and melatonin are both neurohormones, strongly interconnected metabolically. They regulate sleep, apetite, anger and dreaming. Another group of tryptamine derivatives, emphasized here, is the one of dimethyltryptamines. Psilocin, psilocybin, bufotenin are hallucinogens. Triptans are synthetic antimigraine drugs, now widely used.

Key words: bufotenin, melatonin, psilocin, psilocybin, sumatriptan

Съединенията, предмет на настоящата работа, представляват в химично отношение производни на триптамина – биогенен амин, съдържащ индолов пръстен. Триптаминът е открит при организми от всички царства, включително в мозъка на бозайниците, но няма доказана собствена невромодулаторна роля. Триптаминът, или 2-(1H-индол-3-ил)-етанамин, се образува в живите организми чрез неокислително декарбоксилиране от триптофан:



Фиг. 1. *Неокислително декарбоксилиране на триптофан*

Триптаминът е синтезиран от Шпет през 20-те години на XX век по реакцията на Фишер в ксилен като разтворител. Друг интересен синтез е този на Грандберг с допълнителна циклизация-дециклизация в метанол.

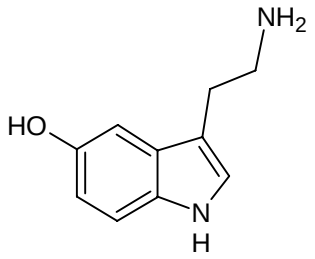
Триптаминът има множество природни производни с физиологична и психозомиметична активност, както и още по-голям брой синтетични хомолози и аналози. Тук е невъзможно да се даде описание на всички, избрани са тези с по-голямо и добре изучено биологично действие. В настоящия обзор не се разглеждат и различните по-сложни химични вещества, които включват триптамин в молекулната си структура и също имат психогенно действие, каквито са например лизергиновата киселина и нейните производни, β-карболините и ибогаинът.

Серотонин и серотонинови рецептори

Серотонинът (5-хидрокситриптамин) е изолиран от Rapport и сътр. от телешки серум през 1948 г. [66]. Въпреки някои неточности при елементния анализ и определянето на температурата на топене тези автори са изследвали значителен брой характеристики: получили са УВ спектрите с абсорбционен максимум при 275 nm, изследвали са потенциометричните титрирани

криви – pK_1 = 4.9 и pK_2 = 9.8. Провели са някои цветни реакции, например тест на Хопкинс-Коул с глиоксилова киселина, при който се появява синьо-виолетово оцветяване.

Серотонинът е синтезиран от 5-бензилоксииндол при субституция на 3-то място с оксалилхлорид [83] или с нитроетилен [59], последвани в първия случай от аминиране с дибензиламин и редукция, а във втория – само от редукция с $LiAlH_4$. Химичната му структура е показана:



Фиг. 2. *Серотонин*

Серотонинът е тъканен хормон, вазоконстриктор и невромедиатор, регулатор на апетита и болкоусещането. Концентрацията му в кръвта (главно в тромбоцитите) нормално е 0,1-0,5 mg/l. Около 80% от серотонина в човешкото тяло се синтезира в ентерохромафинните клетки от стената на храносмилателния тракт и влияе положително върху чревната контракция. В ЦНС серотонинът се концентрира най-вече от клетките на Raphe nuclei от ретикуларната формация и има разнообразни рецептор-медиирани невромодулаторни ефекти.

Биосинтетичната му верига започва от триптофан, който се хидроксилира на пето място под действието на ензима триптофан-5-монооксигеназа (ЕС 1.14.16.4). Ензимът, кратко наречен триптофан-хидроксилаза, е изолиран през 1967 г. [35, 77]. При бозайниците са познати две изоформи – TPH1 (444 АК), TPH2 (490 АК), като и двете се нуждаят от по една молекула тетрахидробиоптерин и Fe^{2+} – по три на молекула белтък – като кофактори. Феройоните, които в случая са специфични активатори от активния център, не могат да бъдат заменени от никакви други; два се свързват с хистидинови остатъци и един – с остатък от глутаминова киселина [26]. Тридименсионалната структура на триптофан-хидроксилазата е установена с рентгеноструктурен анализ [91].

Следващият ензим в биосинтетичната верига е триптофан-декарбоксилаза (декарбоксилаза на ароматните АК), който е познат отдавна и е слабо специфичен (ЕС 4.1.1.28). Катализира лиазното отцепване на въглероден диоксид от карбоксилната група на триптофана. Той се състои от 480 АК при човека и се нуждае от пиридоксалфосфат като кофактор. Интересно е съобщението, че триптофан-декарбоксилазата от Catharanthus roseus, мадагаскарски родственик на зимзелена, е хинопротеин, т.е. използва пиролохинолин хинон (PQQ) като кофактор [64]. В нативно състояние този белтък е 96 kDa.

Заслужава да се отбележи, че докато серотонинът не преминава хематоенцефалната бариера, триптофанът и хидрокситриптофанът я преминават. Серотонинът се метаболира оксидативно до 5-хидроксииндол-3-оцетна киселина, като първият етап се катализира от моноаминооксидазата (ЕС 1.4.3.4), тип А.

В нервната система серотонинът се транспортира през мембраните и се концентрира в пресинаптичните везикули от везикуларния транспортер на моноамини тип 2 (VMAT-2) [89]. Основен механизъм за отстраняване на серотонина от синаптичната празнина е чрез серотониновия транспортер (5-HTT, SERT). Той представлява белтък с молекулна маса 68 kDa, изолиран от тромбоцити [42]. Серотониновият транспортер е трансмембранен канал, който обменя Na^+, Cl^- и серотонин отвън навътре срещу K^+ отвътре навън [51]. Той е и прицелна молекула на инхибиторите на обратното всмукване на серотонина, например индалпин. Като мембранен белтък SERT има свойството в условия in vitro да образува монослоеве на фазовата граница вода/въздух. При добавяне на селективни инхибитори, напр. индалпин или 5-хидроксииндол-3-оцетна киселина, равновесното повърхностно напрежение значително спада, а повърхностното налягане се увеличава [15].

Разнообразните сигнални ефекти на серотонина са в повечето случаи рецептор-медиирани. Серотониновите рецептори (5-HT рецептори) са мембранно-интегрирани белтъци и се кодират от гени от седем семейства [89]. Шест семейства 5-HT рецептори са G-белтък-свързани, седем пъти пронизващи мембраните полипептидни вериги. Изключение представлява 5-HT_3 рецепторът, който е Na^+/K^+ трансмембранен канал. Понастоящем основната част от изследванията на тези рецептори се концентрира върху тяхната генетика и фармакология. Гените им са изолирани, като различните гени от едно семейство, често разположени на различни хромозоми, се експресират диференцирано в различните тъкани и клетъчни популации. Изолирани или синтезирани са голям брой лиганди както агонисти, така и

антагонисти, които се свързват повече или помалко специфично с различните семейства и типове 5-НТ рецептори.

Всички семейства 5-НТ рецептори се експресират в ЦНС. 5-HT_1 рецепторът е свързан с Gi-белтък; инхибира аденилатциклазата. 5-HT_{1A}-типът се открива в пресинаптичните и в постсинаптичните мембрани. Инхибира се от пиндолол. 5-HT_{1B} типът е разположен главно пресинаптично и също се инхибира от пиндолол, а негов агонист е суматриптанът. 5-HT_{1D} рецепторът също се активира от триптани, а се инхибира от кетансерин. Идентифицирани са още гени 5-HTR1E и 5-HTR1F от същото семейство. Всички 5-HT_1 рецептори присъстват и в стените на кръвоносните съдове. Споменатият вече суматриптан, синтетичен агонист на тези рецептори, който е триптамин, ще бъде разгледан по-долу.

5-HT_2 рецепторите са разпространени освен в ЦНС и стените на кръвоносните съдове, още и в периферната нервна система, в стената на гастроинтестиналния тракт и в тромбоцитите. Всички серотонинови рецептори от второто семейство са свързани с G_q-белтъци. Те осъществяват сигналната си функция, като при възбуждане активират фосфолипаза С и повишават вътреклетъчните концентрации на диацилглицерола и на инозитол-трифосфата. Тези рецептори са три типа. 5-HT_{2a} рецепторите имат за агонисти най-важните халюциногени – LSD, 5-Me-O-DMT, 2C-B, псилоцин, псилоцибин, мескалин и други [58]. Инхибират се от кетансерин. 5-HT_{2B} рецепторът свързва специфично MDMA, а 5-HT_{2C} типът има фармакологични характеристики, близки до 5-HT_{2A}. Доскоро се смяташе, че той принадлежи към 5-HT_1 семейството, но с откритието, че е Gq-свързан, както и всички 5-HT_2 рецептори, неговата класификация бе променена [47].

Върху топографията на 5-HT_1 и 5-HT_2 рецепторите в главния мозък на човека са работили много в изследователския център на фирмата Сандоз [33, 34, 62, 63]. Използвайки тритий-белязан серотонин и специфични за типовете радиоактивни лиганди, изследователският колектив е провел авторадиографско картиране на човешкия мозък post mortem. 5-HT_{1A} рецепторите са с най-висока плътност в хипокампуса, ретикуларната формация, кортикални слоеве 1 и 2, някои таламични ядра. В същата статия те разглеждат и топографията на 1c-рецептора, който след обстойни генетични изследвания се оказва идентичен с 5-HT_{2C}, както бе споменато. 5-HT_2 рецепторите в главния мозък са локализирани предимно в слоеве 3 и 5 на кортекса и в хипоталамуса.

Свързването на агонисти към HT_{2a} рецептора има няколко следствия на молекулярно равнище. Първо, амплифицират се глутамат-зависимите постсинаптични потенциали [58], но сумираните експериментални данни от различни организми не дават възможност за еднозначни заключения относно влиянието на 5-HT_{2a} рецептора върху глутамат-зависимата сигнализация. Има хипотези и за допаминергични ефекти на възбуждането на 5-HT_{2a}, както и за възможна роля на ГАМК. Второ, при обстойно изследване на сигналната верига на HT_{2a} рецептора от васкуларни гладкомускулни клетки е установено, че серотонинът и други агонисти инхибират синтеза на NO от тези клетки, предварително стимулирани с интерлевкин-1. Този ефект се потиска от кетансерин [78]. Серотонинът също увеличава цитозолния калций в култивирани клетки от сърце на плъх; ефектът е зависим от протеин-киназа С, но няма доказателства, че е свързан с HT_{2a} рецептора [43].

Секвенцията на 5-HT_2 рецепторите е известна и достъпна в базите данни, но пространствената структура не е решена с никой от „абсолютните" методи – ЯМР и рентгенова дифракция. Затова особен интерес представляват виртуалните модели на молекулната структура на 5-HT_{2C} рецептора [8]. Използвайки скалата на Ейзенберг за хидрофобност, авторите на изследването определят трансмембранните α-спирали; след това спиралите се пакетират виртуално, като се съблюдават няколко параметъра – декартовите координати, отклонението от нормалата към плоскостта на мембраната, азимутът и ротационният ъгъл. Някои параметри са взети от установената експериментално карта на електронната плътност на родопсина. Следват още няколко процедури, отчитащи конформационните флуктуации от зададеното идеално състояние и минимизиране на потенциалната енергия. След това са проведени симулации на лигандното свързване, като за серотонина е определена афинитетна константа Ki = 16 nM. Определени са АК остатъците, с които той се свързва. Взаимодействията включват: солеви мост на протонираната първична аминогрупа с аспартат и серин, ван дер Ваалсово взаимодействие тип „stacking" на индолното ядро с два фенилаланинови остатъка, водородна връзка на индолната иминогрупа със серин и водородни връзки на 5-ОН от серотонина със серинов и с триптофанов остатък. Изследвани са и други лиганди. Моделът е верифициран чрез сравнение с данните за точкови мутанти.

5-HT_3 рецепторът предизвиква специален интерес по две причини. Първо, той единствен от серотониновите рецептори принадлежи на суперсемейството на лиганд-зависимите йонни канали с цистеинова бримка [7]. Разпространен е в някои части на мозъка, но главно в терминалните части на nervus vagus. Трансмембранният канал се изгражда от пет полипептидни вериги, които могат да са идентични или продукт на няколко различни гена (хомо- или хетеропентамер). Установени са пет гена от това семейство – A, B, C, D, E.

При дразнене на храносмилателния тракт ентерохромафинните клетки произвеждат серотонин, той се свързва с 5-HT_3 рецептора и сигналната каскада предизвиква рефлекторно гадене и повръщане. Тези симптоми са характерен страничен ефект на химиотерапията при онкоболни, поради което са разработени значителен брой антиеметични средства – сетрони – антагонисти на 5-HT_3 рецептора. Техният фармакофор се състои от ароматен или хетероароматен пръстен, базичен център и свързваща карбонилна група, която трябва да е копланарна на пръстена. В химично отношение тези препарати принадлежат към карбазолите, индазолите и индолите [75]. Първият препарат от серията е ондансетронът.

Останалите четири семейства серотонинови рецептори са по-слабо изучени, въпреки че явно това скоро ще се промени. Те са активатори на аденилатциклазата с изключение на 5-HT_5 рецептора, който я инхибира.

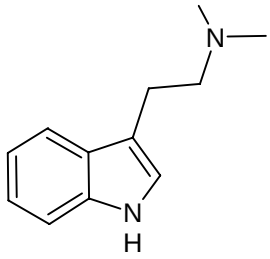
Серотонинът има и множество рецепторнезависими ефекти, доскоро подценявани. На тях обаче се обръща все повече внимание [90]. Авторите показват, че мишка, която не експресира триптофан-хидроксилаза в периферните тъкани, показва намален риск от тромбоза и тромбоемболия, въпреки че ултраструктурата на тромбоцитите остава интактна. При тези условия агрегацията на тромбоцитите in vitro е в рамките на нормата, но тяхната адхезия in vivo е нарушена заради блокирана секреция на адхезивни α-грануларни белтъци. Този факт се дължи на недостига на серотонин, който под действието на трансглутаминази се свързва с малки ГТФ в тромбоцитите при тяхната активация, което е необходимо за превръщането на α-грануларните белтъци в активна форма. Този процес е наречен серотонилиране.

Изследванията в тази област продължават. Показано е, че серотонилиране на белтъци протича и в стените на артериалните кръвоносни съдове, на което се дължи вазоконстрикторният ефект на серотонина [92]. Изследванията са проведени върху култивирани гладкомускулни клетки от аорта на плъх. Анализът, включващ Western blot и масспектрометрия, доказва, че под действието на трансглутаминазата пентиламини, биотин-пентиламини и серотонин се свързват с множество белтъци – α-актин, тежката верига на миозина и др. Активността на трансглутаминазата се потиска от цистамин.

Серотонилирането модулира секрецията на инсулин от β-панкреасните клетки [61]. Изследванията са проведени върху мишка с неактивен ген на триптофан-хидроксилазата, показваща симптоми на тежък диабет. Възстановяването на концентрацията на серотонина възстановява секрецията на инсулин от изолирана клетъчна култура. Електрофизиологичните експерименти показват нарушен поток на Ca^{2+}, докато в норма необходимите за калциевата сигнализация малки ГТФ Rab3a и Rab27a се серотонилират.

Диметилтриптамини

Диметилтриптаминът (фиг. 3) е познат отдавна халюциноген, изолиран от значителен брой растения (напр. Virola, богата и на други индолни алкалоиди), който е активен при пушене и интраназално, но при орален прием активността му е ниска. Типичната му доза е 60-100 mg и бързият му метаболизъм и висок обем на разпределение скъсяват действието му до около час [58]. Той се свързва с 5-$HT_{2a/2c}$ рецепторите [67]. 5-метокси-ДМТ пък е активен в дози 20-30 mg и с още по-късо действие, по-слаб афинитет към рецептора, която съвкупност трудно може да бъде обяснена.

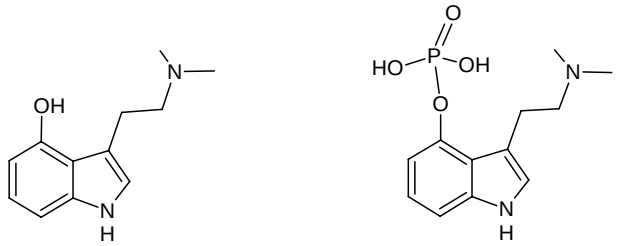


Фиг. 3. *Диметилтриптамин (ДМТ)*

Най-важните производни на диметилтриптамина, на които ще бъде обърнато специално внимание тук, са псилоцинът, псилоцибинът, буфотенинът и триптаните.

Псилоцинът е N, N-диметил-4-хидрокситриптамин, докато в псилоцибина фенолната група е естерифицирана с ортофосфорна киселина. Те са изолирани от Алберт Хофман и сътр. от мек-

сиканската гъба Psilocybe mexicana, а после и синтезирани по химичен път от същия автор [29-31]. Структурно и конформационно псилоцинът е изследван с ЯМР [55]. Данните показват, че третичната аминогрупа има pKa = 8,47. Авторите определят също, че гош-конформацията на страничната верига на 3-то място е предпочетена, но трябва да се имат предвид и особеностите на разтвора in vitro при ЯМР експеримент. Структурата на псилоцина и псилоцибина е показана на фиг. 4.



Фиг. 4. *Псилоцин и псилоцибин*

Един съвременен метод за получаване на псилоцин и ацетилирането му по фенолната група с цел по-добра усвояемост е даден от Никълс [57].

Биосинтетичният път на псилоцина и псилоцибина е изяснен от Стиг Агурел [1-3]. За разлика от биосинтеза на серотонина при животните и човека, тук предпочетеният прекурсор, който се хидроксилира, е диметил-триптаминът. Той се получава в крайна сметка пак от триптофан, който се подлага на лиазно декарбоксилиране и на метилиране по аминогрупата. Изследванията на Агурел са проведени с радиоактивно белязани молекули и имат за цел изясняването на биосинтетичната верига, докато ензимният механизъм на процеса остава непознат. Може да се предположи, че хидроксилирането на четвъртото място протича с помощта на различен ензим от познатата триптофан-хидроксилаза, който би следвало да бъде абсолютно специфичен, тъй като не е известно гъбите продуценти да синтезират алтернативно заместени индоли или дифенолни производни.

Голяма част от съвременните изследвания на псилоцина и псилоцибина са концентрирани върху техния анализ, дейност, която е свързана предимно с техния статус на забранени за търговия вещества. Инфрачервените и масспектрите на псилоцина са получени от Касале [11]. Псилоцибинът, псилоцинът и други диметил-триптамини имат общ базов пик с m/z 58 [6]. Той се получава от молекулния йон-радикал, който се фрагментира до заместен скатол-радикал и диметилметиленамониев йон, на който се дължи базовият пик. Разликата между отделните диметил-триптамини може да бъде направена по пика на заместен скатолов йон, получен при алтернативна фрагментация и резонансно стабилизиран. При псилоцина той е с m/z 147. Псилоцинът е открит и в урина под формата на глюкуронид [38]. β-глюкуроновата киселина е свързана О-гликозидно с фенолната група на псилоцина. Този факт хвърля известна светлина и върху неизяснения метаболизъм на псилоцина в човешкия организъм.

Йохан Гарц е опитал успешно по-меки форми на екстракция от тази с оцетна киселина на Касале [25]. При тях псилоцибинът се запазва интактен. Същият автор е провел и насочена биотрансформация на диетиловия хомолог на ДМТ в култура на Psilocybe cubensis. По този начин е успял да получи N,N-диетиловите хомолози на псилоцина и на псилоцибина [24].

За анализ на псилоцин и псилоцибин от биологични материали са използвани и флуориметрични методи. Псилоцинът е детектиран в гъби и кръвна плазма при хроматографско изследване с флуоресцентна детекция [73]. Като флуоресцентен маркер е използван 4-(N,N-диметиламиносулфонил)-7-(2-хлороформилпиролидин-1-ил)-2,1,3-бензоксадиазол. Същите автори са провели изследване на халюциногенни гъби и за псилоцибин. Методът включва екстракция при меки условия и обратнофазова хроматография [74]. Ценността му се заключава в това, че се определя избирателно псилоцибинът, докато при екстракцията на Касале и последващ масспектрален анализ последният е неотличим от псилоцина. В този случай селективният флуоресцентен маркер е 5-диметиламинонафтален-1-[N-(2-аминоетил)]-сулфонамид.

Псилоцинът и псилоцибинът са класически халюциногени [27, 58, 80, 81]. Те са частични агонисти на серотонина и лиганди на $5HT_{2A}$ рецепторите. Показват също сродство към $5HT_{1A}$ и $5HT_{2C}$ рецептори. Токсичността на псилоцибина е ниска: при плъхове LD_{50} е 280 mg/kg, при интравенозно въвеждане при зайци – около 12 mg/kg. Досега не е известен летален случай при хора от злоупотреба с псилоцибин. Все пак трябва да се има придвид, че злоупотребата е перорална, а за да се достигнат опасни дози, шейсеткилограмов човек трябва да изяде повече от килограм сушени гъби! При тази ниска токсичност псилоцибиновите специфични психозомиметични ефекти са доста мощни. Те продължават около 6-8 часа след приема, като „платото" на ефекта е от края на първия до края на третия час. Леките дози са около и под 10 mg псилоцибин, докато дози над 50 mg (5 g гъби) се считат за високи. Леките дози

се характеризират обикновено с повишено настроение, улесняване на социалния контакт, псевдохалюцинации (като цветни дъги при затворени очи), еуфория. Високите дози отключват интроспективни преживявания, халюцинации и са получили точното име „пътешествие" или „trip". Не съществуват гаранции, че такова пътуване ще бъде приятно. Известното като „bad trip" състояние представлява временно разстройство и се характеризира обективно с перцептуални нарушения, мидриаза, дисфория, тахикардия. При хора с някакво психично разстройство то обикновено се усилва, което довежда такива хора до агресивни и панически реакции, суицидни действия, конвулсии и продължителни психотични епизоди. Не са изключени и психогенни кардиоваскуларни реакции.

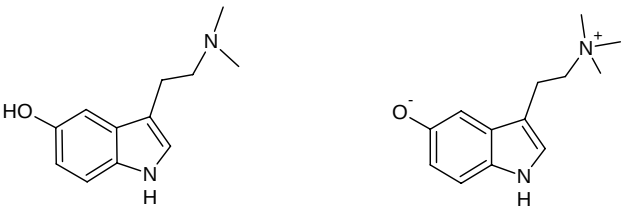
Главно с цел изследване на 5-НТ рецепторите са синтезирани и значителен брой триптаминови хомолози и аналози на псилоцина и псилоцибина. В едно такова изследване са синтезирани 15 съединения – 1-заместени, 4-заместени, 6-заместени, α-заместени, N-заместени пиролидини и пиперидини [76]. Определен е афинитетът на съединенията към 5-HT_2 рецепторите и е използвана мишка като етологичен модел. Псилоцинът, псилоцибинът и някои аналози потискат сърбежа, предизвикан от подкожна инжекция серотонин. Не може да се счита за доказано, че всички тези ефекти се дължат именно на 5-HT_2 рецепторите, а не на друго от семействата серотонинови рецептори. В подкрепа на мнението на авторите обаче е фактът, че най-добрите инхибитори показват и високо сродство към рецептора – 1-метилпсилоцин, 1-метилпсилоцибин, 1-етилпсилоцибин и 4-флуоро-DMT.

Отново върху гризачи като моделна система са изследвани и халюциногенните ефекти на N,N-дипропилтриптамина [21]. Разчитайки обаче само на етиологични резултати, авторите не са могли да направят нещо повече от предположения относно рецептор-медиираното действие на изследваното вещество.

Псилоцинът и псилоцибинът са изолирани от голям брой базидиеви гъби от сем. Strophariaceae (Psilocybe sp.), Bolbitaceae (Panaeolus sp.) и др. Наричани често „магически гъби", до неотдавна тяхната класификация бе базирана изцяло на морфологични принципи. Една от малкото ползи от тяхната забрана за науката е и опитът за тяхната класификация на базата на структурата на гените на рибозомната РНК [44, 53]. Те съдържат вътрешни транскрипционни спейсъри (ITS), разделящи консервативните РНК-кодиращи последователности, които се транскрибират, а по-късно делетират при зреенето на транскрипционния продукт. Броят и дължината на спейсърите е често видово-специфичен. По този начин са класифицирани около 20 вида от родовете Psilocybe и Panaeolus.

Буфотенинът е известен отдавна, открит още в края на XIX век [48]. Той се получава от жаби от рода Bufo (около 250 вида), от кожата и от паротидните им жлези. Изолиран е и от южноамерикански растения, напр. Anadenanthera colubrina (Leguminosae). Халюциногенното му действие е доказано [84]. Дозите и фармакокинетиката му са подобни на тези на 5-Me-O-DMT. Доза от 250-300 mg/kg прекъсва дишането (LD_{50}). Синтезът на буфотенина е направен едновременно с този на серотонина от Speeter и Anthony [83].

В условия in vivo в организма на жабите буфотенинът търпи биохимични трансформации, водещи до близки по структура индолни алкалоиди – дехидробуфотенин, буфотенидин, буфотионин [49]. Структурата на дехидробуфотенина и буфотионина е установена кристалографски [32]. На фиг. 5 са представени формулите на буфотенина и на буфотенидина.



Фиг. 5. *Буфотенин и буфотенидин*

Съдържанието на буфотенина и сродните му алкалоиди е използвано при съвременното класифициране на жабите Bufo в Бразилия [49, 50]. Така са определени 59 хемораси с различен тип секреция при не по-малко от 10 вида (при най-скромен поглед върху многообразието). Качествените резултати от тънкослойна хроматография и масспектрометрия се разполагат в матрица, която е a priori само от единици и нули. Анализът на минорите позволява да се построи филогенетично дърво на изследваната група от хемораси.

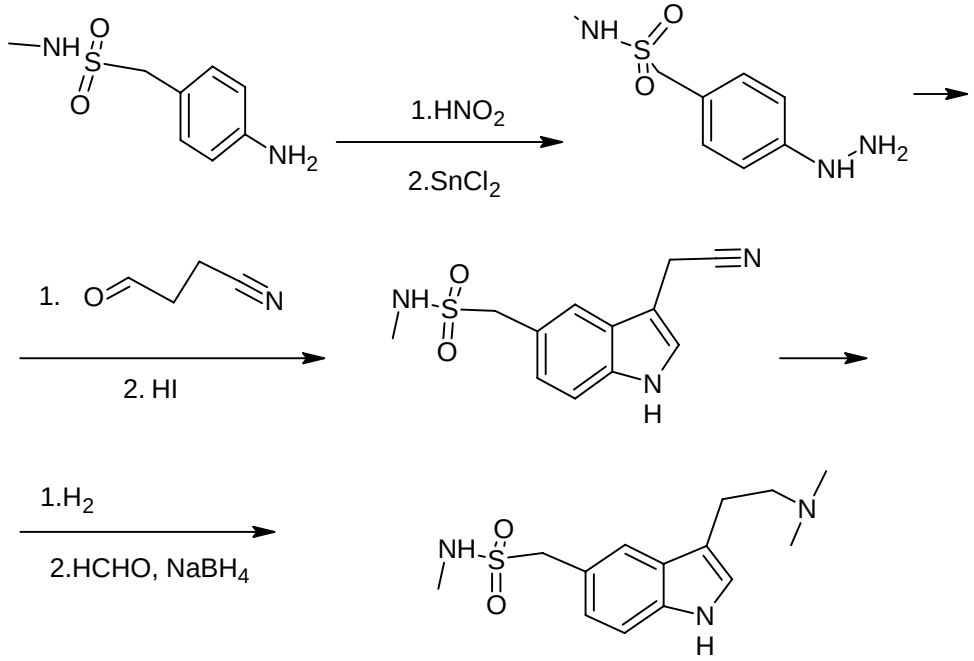
Триптаните са синтетични диметилтриптамини, продукт на фармацевтичната химия, които понастоящем се използват широко в клиничната практика като антимигренни средства. Исторически първото синтезирано вещество от серията е суматриптанът, произвеждан от Glaxo-Smith-Kline [20]. Синтезът му започва от 1-(4-ами-

нофенил)-N-метилметансулфонамид, който чрез диазотиране и по Фишер се превръща в 5-заместен индолацетонитрил. Последният се подлага на редукция и метилиране.

Други фармацевтични компании произвеждат алтернативни препарати – алмотриптан на Almirall, ризатриптан на Merck и золмитриптан на Astra-Zeneca.

Предложен е различен от показания метод за синтез на триптани [10]. Той използва реакцията на Грандберг за синтез на триптамини, които се подлагат после на редуктивно метилиране. Добивът на 5-заместени триптамини по Грандберг обаче е нисък. Допълнителна трудност е и кондензацията на триптамин-метанола със сулфонови киселини, която изисква протектиране на индолната иминогрупа.

Триптаните са агонисти на 5-$HT_{1B/1D}$ рецепторите. Чрез сигнал за инхибиране на аденилатциклазата и забавяне на метаболизма в експресиращите тези рецептори неврони триптаните потискат болката. Показано е, че суматриптанът и серотонинът релаксират контракциите на свински коронарни артерии, предизвикани от $PGF_{2\alpha}$ [79]. Механизмът на действие на триптаните включва потискане на продукцията на пептид от семейството на калцитонин-подобните (CGRP), както и на субстанция P [37].



Фиг. 6. *Синтез на суматриптан*

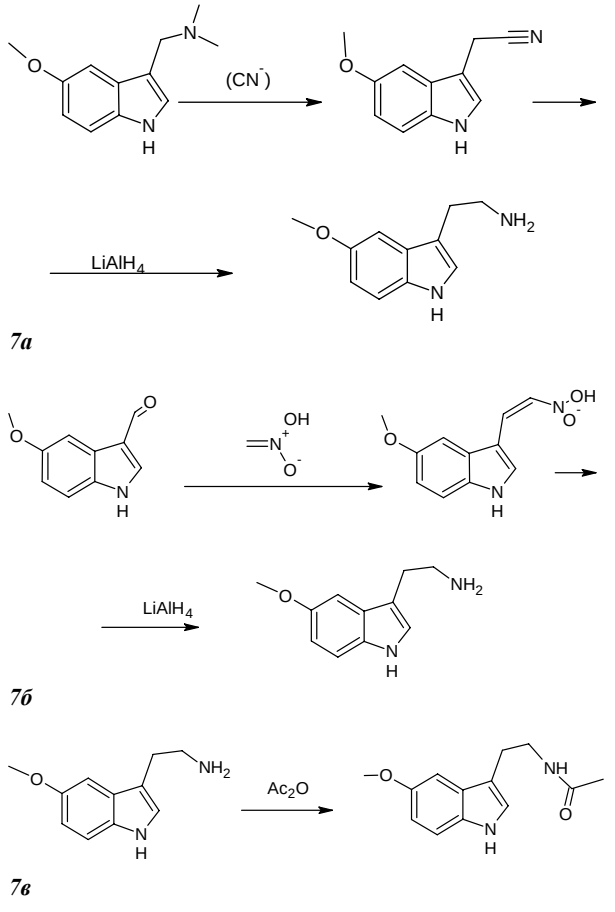
Мелатонин

Мелатонинът, или 5-метокси-N-ацетилтриптамин, е триптаминово производно, което в ниски концентрации е широко разпространено в множество организми – едноклетъчни, растения, гъби и животни. При гръбначните и човека той се синтезира главно от пинеалната жлеза, разположена върху средния мозък и свързана с междинния, под контрола на супрахиазматичното ядро [60]. Биосинтезът в пинеалната жлеза следва устойчив цикъл, зависим от светлината в околната среда. Нощният максимум достига 200 ng/l плазма, а дневният минимум е около 10 ng/l. В малки количества мелатонин се синтезира също от ретината, костния мозък, кожата и кръвните плочици. Мелатонинът е изолиран от Арон Лърнър през 1958 г. от говежда пинеална жлеза [45]. Той е класифициран от него като индол чрез реактив на Ерлих – р-диметиламино-бензалдехид. Реактивът атакува електрофилно С2 от индолния пръстен и дава синьо оцветяване. Максимумът на УВ абсорбцията на мелатонина е при 273 nm. Мелатонинът флуоресцира в близката УВ област – 338 nm, с максимално възбуждане на флуоресценцията при 295 nm.

Скоро след това той е синтезиран от Шмушковиц (Szmuszkovicz). Той провежда синтеза по два пътя, и двата започващи от 5-метоксииндол [85]. По първия начин от 5-метоксииндол се получава 5-метоксиграмин чрез аминометилиране по Mannich, диметиламино-групата се измества с цианидна и полученият нитрил се редуцира и ацетилира. По втория начин на 5-метоксииндол-3-алдехид, който

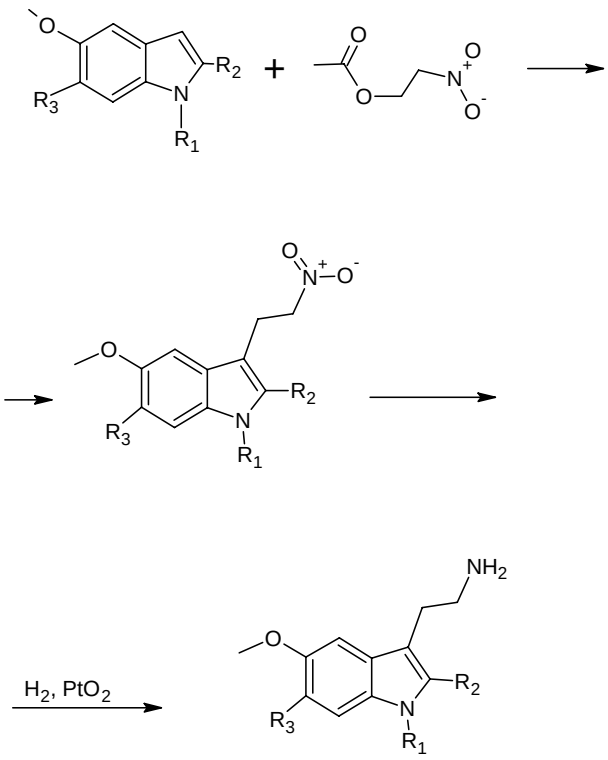
може да бъде получен по Вилсмайер-Хаак, се действа с нитрометан. При една реакция „тип Хенри" се получава ненаситено производно, наречено от Шмушковиц 5-метокси-β-индоленинидениометил нитронат. Той се подлага на редукция с $LiAlH_4$ и се ацетилира. Тъй като едновременно синтезира и 5-метоксииндол-3-оцетната киселина, Шмушковиц дава и още един метод за нитрила – от индолен Гриняров реактив и хлороацетонитрил. ИЧ спектърът на мелатонина, снет от Шмушковиц, съдържа характеристични ивици: NH: 3240 cm^{-1}; C=O I: 1627 cm^{-1} ; C=O II: 1555 cm^{-1} ; C-O: 1240, 1220 cm^{-1}; C=C: 1620, 1587, 1492 cm^{-1} ; C-H: 828, 810, 800 cm^{-1} .

Още три метода за синтез на мелатонин заслужават специално внимание.



Фиг. 7. *Синтез на мелатонин по Szmuszkovicz*

През 1978-1979 г. в обширно изследване на мелатонина и 14 негови аналога е използван методът на Leimgruber-Batcho за синтез на индоли. Накратко, диметиламиноформалдехид диметилацетал реагира с метилната група на заместен о-нитротолуен и се получава производно с ненаситена странична верига. При каталитична редукция с H_2 се получава индол. Мелатонинът и неговите 1-, 2-, 4- и 7-заместени аналози се получават, като на заместения индол се действа с нитроетилацетат, който при термолиза in situ дава нитроетилен (фиг. 8). В случая протича присъединяване по Михаел. Освен това авторите изследват и антиовулационната активност на мелатонина и аналозите му при мишки. Най-висока активност показват 2-метилмелатонинът, 6-хлоромелатонинът, N-пропионил- и N-бутаноил-5-метокситриптаминът [23].

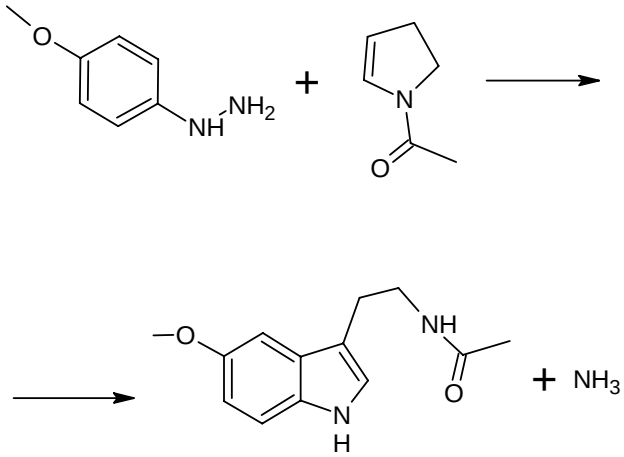


Фиг. 8. *Синтез на мелатонин по Flaugh (последният етап е аналогичен на Шмушковиц)*

Като се използва енамиден еквивалент на аминобутиралдехид в един Фишеров синтез, мелатонинът се получава лесно и с добив 75% [52]. Реакцията протича между р-метоксифенилхидразин и N-ацетил-Δ2-пиролин. Неудобство представлява обаче фактът, че вторият от тези реактанти не е търговски достъпен. Той се получава при внимателно окисление на пиролидин и на получения пиролин се действа с ацетилхлорид.

Още по-нов метод за синтез на мелатонин, серотонин и буфотенин е предложен от група френски учени и има повече теоретично значение [69]. Синтезът е многостадиен и започва от диоксаспиропротектирано бензилиминно производно на циклохександиона. Следва сложно протичащо анелиране на кондензиран с циклохексановия пръстен пиролинонов пръстен. След няколко реакции

на елиминиране пръстенната система се ароматизира. Дадени са и масспектрите на синтезираните вещества. За мелатонина: m/z: 232 (M^+, 29), 173 (100), 160 (95). В някои бази данни (NIST) основният пик е при 160.



Фиг. 9. *Синтез на мелатонин по Marais и Holzapfel*

Предложени са фармакофорни модели, призвани да обяснят действието на мелатонина [82]. Използвайки метода на comparative molecular field analysis (CoMFA), изследователите стигат до заключението, че страничната етиламинова верига има максимално взаимодействие с мелатониновия рецептор в сгъната конформация. Амидният азотен атом е над равнината на пръстена, на разстояние 0,2 nm от C3 и на 0,49 nm от метоксилния кислороден атом.

Ab initio квантовохимичните изчисления доверждат до заключението, че са възможни 4 конформации със сгъната странична верига [88]. Съставени са конформационни карти на потенциалната енергия, от които се вижда, че с минимална енергия е състоянието, при което ъгълът между C2—C3 на индолния пръстен и β-C—α-C е около 280°, а следващите два ротационни ъгъла в страничната верига – съответно 300° и 120°. Същите автори са направили изчисления върху граничните молекулни орбитали и реактантността на молекулата. Както HOMO, така и LUMO практически не зависят от конформацията, тъй като са π-орбитали и са локализирани върху индолното ядро. Съответно изчисленията върху твърдостта на молекулата, сравнени с експериментални данни върху йонизационния потенциал и електронното сродство определят мелатонина като една доста мека молекула с твърдост около 5,4 eV. Йонизационните потенциали на мелатонина са получени чрез фотоелектронна спектроскопия [40].

За нуждите на анализа на мелатонин може да се използва течна хроматография (HPLC) с УВ детекция. Дори когато се използва поли(N-изопропилакриламид) като носител на неподвижната фаза, който търпи фазов преход от втори род при 32°C, под и над точката на прехода хроматограмите са сходни [5]. От смес на трите близки индола най-напред елуира триптофанът, следва пикът на мелатонина с време на задържане около 10 min при скорост 1 ml/min, накрая елуира серотонинът. При условията на проведения анализ не се наблюдават „опашки", нито застъпване на пикове.

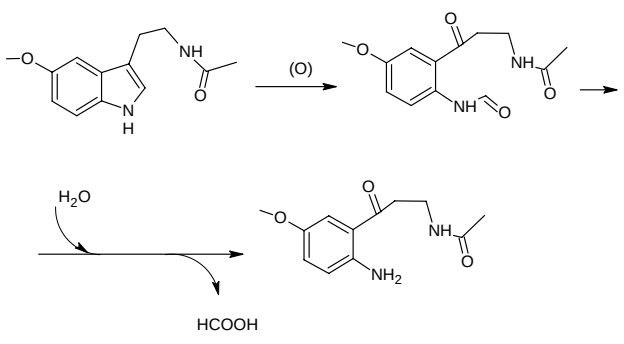
Мелатонинът се синтезира в условия in vivo от серотонин в две последователни реакции. Първата е ацетилиране по първичната аминогрупа, което е и скоростоопределящ етап. Ацетилтрансферазна активност в пинеалната жлеза е наблюдавана отдавна от Клайн [39]. Поради много малките количества и зависимостта на каталитичната активност на екстрактите от циркадните ритми, пречистването и кинетичните изследвания на този ензим са изключително трудоемки [12]. Той се състои от 207 АК остатъка (EC 2.3.1.87). Човешкият ген на серотонин N-ацетилтрансферазата е изолиран при скрининг на геномна библиотека [13]. Отворената рамка на четене има 80% идентичност с тази при овца и плъх. Генът съдържа четири екзона и се експресира в мозъка, пинеалната жлеза и ретината. По-късно научният интерес се насочва към синтетични инхибитори на серотонин-N-ацетилтрансферазата (AANAT, арилалкиламин-N-ацетилтрансфераза). Работите показват, че бромоацетилният аналог на мелатонина е добър инхибитор, вероятно поради свързване с редуциран коензим А [9]. Резултатите от молекулния дизайн и неговата експериментална верификация водят до синтеза и на N-[2-(5-метансулфониламино-бензо[b]тиофен-3-ил)-етил]бромоацетамид – обещаващ инхибитор на ензима с ниско сродство към мелатониновия рецептор [54].

Втората реакция представлява метилиране на ацетилсеротонина по фенолната хидроксилна група. Донор на метилна група е S-аденозил-L-метионин. Реакцията се катализира от хидроксииндол-О-метилтрансфераза (EC 2.1.1.4). При човека този ензим има три изоформи, продукти на алтернативен сплайсинг, които се състоят съответно от 345, 298 и 373 АК. Изолиран е от Акселрод през 1961 г. [4]. Генетичният анализ е направен значително по-късно [65, 72]. Изненадващ се оказва фактът, че въпросната метилтран-

сфераза се експресира не само в пинеалоцитите и ретината, а и в имунни клетки. Активността ѝ, определена по флуоресценцията на мелатонина, е около 900 pmol/h за mg белтък [36].

При гръбначните биосинтезът на мелатонин се регулира от ретинохипоталамичния тракт, свързващ ретината със супрахиазменото ядро, което е главен циркаден осцилатор [60]. То е разположено непосредствено над оптичната хиазма до хипоталамуса. Активиращият синтеза сигнал тръгва от меланопсин-съдържащите ретинални ганглиеви клетки, открити от Russell Foster, чиито аксони свършват в супрахиазменото ядро. Постганглийните фибри от ядрото предават сигнала през интермедиолатералните коренчеви неврони в гръбначния мозък до горния цервикален ганглий [68]. Неговите израстъци възбуждат пинеалоцитите чрез норепинефрин като синаптичен медиатор. Пинеалоцитите експресират по мембраната си β-адренергични рецептори, спрегнати с G_s-белтък, който пуска вътреклетъчната сигнална каскада, активираща серотонин ацетилтрансферазата. Секретираният мелатонин през нощта в цереброспиналната течност е с концентрации 20 пъти по-високи от тези в плазмата. Мелатонинът има къс полуживот, концентрациите спадат биекспоненциално, като разложената функция дава две полувремена – съответно 2 и 20 min. В черния дроб той се катаболира от P_{450} зависимите оксигенази CYP1 и се екскретира като мелатонин-6-сулфат. От биологична гледна точка този път е сравнително маловажен.

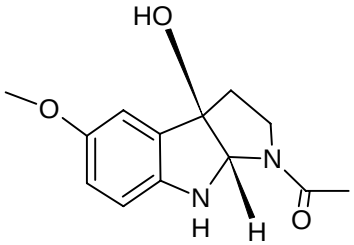
Много по-значителен е пътят, по който мелатонинът се разгражда до заместен кинурамин. Той представлява една антиоксидантна каскада с голям капацитет и при по-нисшите организми именно това е главната функция на мелатонина. През 1974 г. става известно, че в екстракти от заешки мозък мелатонинът се катаболизира до Nγ-ацетил-N2-формил-5-метоксикинурамин при оксидативно скъсване на пиролното ядро от индолния пръстен. Този метаболит след това хидроксилазно дава Nγ-ацетил-5-метоксикинурамин [28].



Фиг. 10. *Антиоксидантно действие на мелатонина*

Авторите не успяват да пречистят ензимите, осъществяващи окислението, и работят с екстракти с каталитична активност. Сега е известно, че мелатонинът присъединява молекула кислород със съдействието на индоламин-2,3-диоксигеназа (ЕС 1.13.11.52), изолирана през 1990 г. [14]. Тя е желязосъдържащ белтък.

Мелатонинът свързва и гаси кислородните радикали и чрез неензимна радикалова реакция [86]. Това лесно се обяснява, като се има предвид „мекостта" на мелатониновата молекула, както вече бе споменато. Хидроксилният радикал се свързва на трето място, а π-връзката C2—C3 се скъсва; единичният електрон свързва C2 с иминния азот от лактимната тавтомерна форма на амида и това води до вътрешномолекулна циклизация. Полученият цикличен радикал с несдвоен електрон в страничната верига гаси втори хидроксилен радикал, отделя се вода и карбонилната група се възстановява. Полученото съединение, открито в урината, е наречено 3-хидроксимелатонин – малко дразнещо, като се има предвид наличието на нов пръстен. Структурата му е доказана с COSY ЯМР.



Фиг. 11. *3-Хидроксимелатонин*

Мелатонинови рецептори и техни синтетични лиганди

При бозайниците и човека мелатонинът е главната хронобиотична молекула. Посредством неговото действие вътрешните физиологични ритми се синхронизират с ритмите на околната среда.

Това негово действие е рецептор-медиирано [60]. Известни са два рецептора за мелатонин – MT_1 и MT_2. При синхронизиране на денонощния ритъм мелатонинът действа като хормон на съня. Екзогенната администрация на мелатонин в светлата част на денонощието има приспивателен ефект. Приемът на 5 mg мелатонин ускорява биологичния часовник с 1,5 h, ако е приет вечерта, и сериозно го забавя, ако е приет рано сутринта. Мелатонинът е използван при експерименти за регулация на съня с доброволци от трансконтинентални полети.

Мелатонинът също регулира репродуктивния цикъл при животни със сезонна сексуална активност. Той потиска секрецията на гонадотропин-освобождаващия неврохормон от хипоталамуса. По този начен се намалява продукцията на лутеинизиращ и фоликулостимулиращ хормон. Тази връзка съществува и при човека. Открити са МТ рецептори в репродуктивните органи и рецептори за полови хормони в пинеалната жлеза, което подсказва доста сложни механизми за авторегулация. Нормалната или увеличена секреция на мелатонин също намалява подкожната тлъстина. Докладвани са и редица други ефекти върху сърдечно-съдовата и костната системи, които не могат да се считат за окончателно доказани, както и наличието на други топоси, свързващи мелатонин, различни от MT_1 и MT_2 рецепторите, но тези съобщения не издържат на здравословния научен скепсис.

МТ рецепторите са открити като специфични мелатонин-свързващи топоси в края на 80-те години на XX век [19]. Освен мелатонин, те свързват и 2-йодомелатонин с почти същия афинитет (много висок), което подпомага авторадиографските изследвания. MT_1 и MT_2 рецепторите са клонирани [70, 71]. Те принадлежат към суперсемейството на G-белтък-свързаните трансмембранни рецептори. Спрегнати с Gi-белтъци, активирането на тези рецептори води до инхибиране на аденилат-циклазата и до забавяне на метаболизма на прицелните клетки. MT_1 рецепторите представляват полипептидни вериги с дължина 350 АК остатъка и на две места в извънклетъчните бримки са гликозилирани по остатъците от аспарагин, а две от извънклетъчните бримки са свързани с дисулфиден мост. MT_2 рецепторите имат дължина на веригата 362 АК, едно място за гликозилиране в извънклетъчната част, по аспарагин, както и подобен дисулфиден мост. MT_1 рецепторите се експресират в супрахиазменото ядро, pars tuberalis на хипофизата. MT_2 рецепторите се експресират в ретината и помалко в хипокампуса. Мелатонинът се свързва и с двата рецептора с висок афинитет – pKi е съответно 9,58 и 9,47 [22]. MT_1 рецепторите са строго специфични и с подобен афинитет свързват само 2-метил и 2-йодомелатонин, а малко послабо N-ацетилсеротонин. MT_2 рецепторите са по-толерантни. Те свързват N-пропаноил-7-бромо-5-метокситриптамин с по-висок афинитет от мелатонина [22]. Докато седем-заместените производни са синтезирани по втория метод на Шмушковиц, то две-заместените най-удобно се синтезират по Фишер [56].

Въпреки че мелатониновите рецептори са обект на изследователска работа вече двайсетина години, интимните биохимични механизми, по които задействаните при тяхното възбуждане сигнални каскади осъществяват физиологичните функции на мелатонина, остават непознати. Сериозна трудност представлява невъзможността да се построи експериментална система за директно изследване, която да даде възпроизводими резултати. Много от заключенията са направени на базата на локализиране на информационни РНК или с имунохимични техники. Недефиниран точно остава и фармакофорът на мелатонина. В опит да се намерят специфични антагонисти и агонисти на рецепторите са синтезирани огромен брой съединения. 1-N-субституираните съединения като цяло проявяват на порядъци по-нисък афинитет [46]. Експериментите с изотиоцианато-субституирани аналози не дават голяма надежда, въпреки че са използвани успешно при изследването на сходни мембранни рецептори [87]. Белите петна в познанието развихрят въображението на изследователите и са предизвикателство за експерименталните им умения. Синтезирани и фармакологично изследвани са димерни мелатонинови производни [18]: 4- и 7-азаиндолни димери [41]. Частичен успех е замяната на ацетилния остатък с такъв от етантионова киселина [16]. Не остават назад и молекулярните биолози – хипотезата, че мелатонинът свързва специфично калмодулин и по този начин инхибира Е2 естрогенния рецептор, се базира на сериозни, но косвени данни, които нямат доказателствена сила [17].

Библиография

1. A g u r e l l , S., S. Blomkvist et P. Catalfomo. Biosynthesis of psilocybin in submerged culture of Psylocybe cubensis. Incorporation of labeled tryptophane and tryptamine. – Acta Pharmaceutica Suecia, **3**, 1966, № 1, 37-44.
2. A g u r e l l , S. et J. Nilson. Biosynthesis of psilocybin part II. – Acta Chemica Scandinavica, **22**, 1968, 1210-1218.
3. A g u r e l l , S. et J. Nilson. A biosynthetic sequence from tryptophan to psilocybin. – Tetrahedron Lett., **9**, 1968, 1063-1064.
4. A x e l r o d , J. et H. Weissbach. Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. – J. Biol. Chem., **236**,1961, № 1, 211-213.
5. A y a n o , E. et al. Analysis of melatonin using a pH- and temperature responsive aqueous chromatography system. – J. Chromatogr. A, **1156**, 2007, 213-219.
6. B a r k e r , S., M. Littlefield-Chabaud et C. David. Distribution of the hallucinogens N,N-dimethyltryptamine and 5-methpxy-N,N-dimethyltryptamine in rat brain following intraperitoneal injection: application of a new zsolid phase extraction LC-APcI-MS – isotope dilution method. – J. Chromatography B, **751**, 2001, 37-47.

7. Barnes, N. et al. The 5-HT_3 receptor – the relationship between structure and function. – Neuropharmacology, **56**, 2009, № 1, 273-284.
8. Bray, J. et W. Goddard III. The structure of human serotonin 2c G-protein-coupled receptor bound to agonists and antagonists. – Journal of Molecular Graphics and Modelling, **27**, 2008, 66-81.
9. Beaurain, N. et al. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel derivatives as serotonin N-acetyltransferase inhibitors. – J. enzyme inhibition and medicinal chemistry, **17**, 2002, 409-414.
10. Bosch, J. Et al. Synthesis of 5-(sulfamoylmethyl)indoles. – Tetrahedron, **57**, 2001, 1041-1048.
11. Casale, J. An aqueous-organic extraction method for the isolation and identification of psilocin from hallucinogenic mushrooms. – J. Forensic Sc., **30**, 1985, 247-250.
12. Coon, S. et al. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. – Science, **270**, 1995, 1681-1683.
13. Coon, S. et al. The human serotonin N-acetyltransferase gene (AANAT): structure, chromosomal localization and tissue expression. – Genomics, **34**, 1996, 76-84.
14. Dai, W. et S. Gupta. Molecular cloning, sequencing and expression of human interferon gamma inducible indoleamine 2,3 dioxygenase cDNA. – BBRC, **168**, 1990, № 1, 1-8.
15. Dalencon, F. et al. Specific interactions between the human serotonin transporter and serotonin analogs at the solution/air interface. – Colloids and Surfaces B, **9**, 1997, 197-203.
16. Davies, D. et al. Binding affinity and biological activity of oxygen and sulfur isosteres at melatonin receptors as a function of their hydrogen bonding capability. –Bioorganic Chemistry, **32**, 2004, 1-12.
17. Del Rio, B. et al. Melatonin, an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor α via calmodulin. – J. Biol. Chem., **279**, 2004, № 37, 38294-38302.
18. Di Giacomo, B. et al. Synthesis and biological activity of new melatonin dimeric derivatives. – Bioorg. Med. Chem., **15**, 2007, 4643-4650.
19. Dubocovich, M. Pharmacology and function of melatonin receptors. – FASEB J., **2**, 1988, № 12, 2765-2773.
20. Evans, B., A. Oxford et D. Butain. 5-Substituted-3-aminoalkyl indole derivatives for migraine. – US Patent, 4785016, 1988.
21. Fantegrossi, W. et al. Hallucinogen-like effects of N,N-dipropyltryptamine (DPT): Possible mediation by serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in rodents. – Pharmacology, Biochemistry and Behavior, **88**, 2008, 358-365.
22. Faust, R. et al. 7-Substituted-melatonin and 7-substituted-1-methylmelatonin analogues: effect of substituents on potency and binding affinity. – Bioorg. Med. Chem., **15**, 2007, 4543-4551.
23. Flaugh, M. et al. Synthesis and evaluation of the antiovulatory activity of a variety of melatonin analogues. – J. Med. Chem., **22**, 1979, № 1, 63-69.
24. Gartz, J. Biotransformation of tryptamine derivatives in mycelial cultures of Psilocybe. – J. Basic. Microbiol., **29**, 1989, № 6, 347-352.
25. Gartz, J. Extraction and analysis of indole derivatives from fungal biomass. – J. Basic. Microbiol., **34**, 1994, № 1, 17-22.
26. Hasegawa, H. et A. Ichiyama. Distinctive iron requirement of tryptophan 5-monooxygenase: TPH_1 requires dissociable ferrous iron. – BBRC, **338**, 2005, 277-284.
27. Hasler, F. et al. Acute psychological and physiological effects of psilocybin in healthy humans: a double-blind, placebo controlled dose effect study. – Psychopharmacol., **172**, 2004, № 2, 145-156.
28. Hirata, F. et O. Hayaishi. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. – J. Biol. Chem., **249**, 1974, № 4, 1311-1313.
29. Hofmann, A. et al. Psilocybin ein psychotroper Wirkstoff aus dem mexikanischen Rauschpilz. – Rev. Mycologie, **22**, 1958, 17-21.
30. Hofmann, A. et al. Psilocybin and psilocin. – Helvetica Chimica Acta, **42**, 1959, 1557-1572.
31. Hofmann, A. LSD – My Problem Child. – McGraw-Hill Book Company, 1980.
32. Honda, K. et al. Structure of bufothionin. – Acta Crystallographica C, **47**, 1991, № 7, 1506-1508.
33. Hoyer, D. et al. Serotonin receptors in the human brain I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT1A recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites. – J. Brain Res., **376**, 1986, № 1, 85-96.
34. Hoyer, D. et al. Serotonin receptors in the human brain II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1C} and 5-HT_2 recognition sites. – J. Brain Res., **376**, 1986, 1, 97-107.
35. Ichiyama, A. et al. Enzymic studies on the biosynthesis of serotonin in mammalian brain. – J. Biol. Chem., **245**, 1970, 1699-1709.
36. Itoh, M., A. Hattori et Y. Sumi. Hydroxyindole-O-methymtransferase activity assay using HPLC with fluorometric detection: determination of melatonin enzymatically formed from N-acetylserotonin and S-adenosyl-L-methionine. – J. Chromatogr. B, **692**, 1997, 217-221.
37. Johnston, M. et A. Rapoport. Triptans for the management of migraine. – Drugs, **70**, 2010, № 12, 1505-1518.
38. Kamata, T. et H. Tsuchihashi. Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in urine samples. – J. Chromatogr. B, **796**, 2003, 421-427.
39. Klein, D. et J. Weller. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. – Science, **169**, 1970, 1093-1095.
40. Kubota, M. et T. Kobayashi. Electronic structures of melatonin and related compounds studied by photoelectron spectroscopy. – Journal of Electron Spectrodcopy and Related Phenomena, **128**, 2003, 165-178.
41. Larraya, C. et al. Preparation of 4-azaindole and 7-azaindole dimmers with a bisalkoxyalkyl spacer in order to preferentially target melatonin MT_1 receptors over melatonin MT_2 receptors. – Eur. J. Med. Chemistry, **39**, 2004, 515-526.
42. Launay, J. et al. One-step purification of serotonin transporter located at the human platelet plasma membrane. – J. Biol. Chem., **267**, 1992, № 16, 11344-11351.
43. Lee, H. et C. Wu. Serotonin-stimulated increase in cytosolic Ca2+ in cultured rat heart endothelial cells. – Eur. J. Pharmacol., **384**, 1999, № 1, 53-56.
44. Lee, J., M. Cole et A. Linacre. Identification of members of the genera Panaeolus and Psylocybe by a DNA test. A preliminary test for hallucinogenic fungi. – Forensic Science International, **112**, 2000, 123-133.
45. Lerner, A. et al. Isolation of melatonin, yhe pneal gland factor that lightens the melanocytes. – J. Am. Chem. Soc., **80**, 1958, № 10, 2857.
46. Lira-Rocha, A., O. Espejo-Gonzalez et E. Naranjo-Rodrigez. Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues. – Eur. J. Med. Chemistry, **37**, 2002, 945-951.
47. Lucaites, V. et al. Receptor subtype and density determine the coupling repertoire of the 5-HT_2 receptor subfamily. – Life Sci., **59**, 1996, № 13, 1081-1095.
48. Lyttle, T., D. Goldstein et J. Gartz. Bufo toads and bufotenine: fact and fiction surrounding an alleged psychedelic. – J. Psychoactive drugs, **28**, 1996, № 3, 267-290.
49. Maciel, N. et al. Composition of indolealkylamines of Bufo rubescens cutaneous secretions compared to six other Brasilian bufonids with phylogenetic implications. – Comparative Biochemistry and Physiology B, **134**, Elsevier, 2003, 641-649.
50. Maciel, N. et al. A phylogenetic analysis of species in the Bufo crucifer group, based on indolealkylamines and proteins from skin secretions. – Biochemical Systematics and Ecology, **34**, 2006, 457-466.
51. Mager, S. et al. Conducting states of mammalian serotonin transporter. – Neuron, **12**, 1994, 845-859.
52. Marais, W. et C. Holzapfel. On a facile synthesis of melatonin and other related indoles. – Synthetic Communications, **28**, 1998, № 19, 3681-3691.
53. Maruyama, T. et al. Phylogenetic relationship of psychoactive fungi based on rRNA gene for a large subunit and their iden-

tification using TaqMan assay (II). – Forensic Science International, **163**, 2006, 51-58.
54. Mesangeau, C. et al. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel benzo[b]thiophene derivatives as serotonin N-acetyltransferase (AANAT) inhibitors. – J. enzyme inhibition and medicinal chemistry, **18**, 2003, № 2, 119-125.
55. Migliaccio, G. et al. Comparison of solution conformational preferences for the hallucinogens bufotenin and psilocin using 360 MHz proton NMR spectroscopy. – J. Med. Chem., **24**, 1981, № 2, 206-209.
56. Nenajdenko, V. et al. Convenient synthesis of melatonin analogues: 2- and 3-substituted-N-acetylindolylalkylamines. – Tetrahedron, **60**, 2004, 11719-11724.
57. Nichols, D. et S. Frescas. Improvements to the synthesis of psilocybin and a facile method for preparing the O-acetyl prodrug of psilocin. – Synthesis, 1999, № 06, 935-939.
58. Nichols, D. Hallucinogens. – Pharmacology & Therapeutics, **101**, 2004, 131-181.
59. Noland, W. E. et R. A. Hovden. A new synthesis of serotonin. – J. Org. Chem., **24**, 1959, № 6, 894-895.
60. Pandi-Perumal, S. et al. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? – FEBS J., **273**, 2006, № 13, 2813-2838.
61. Paulmann, N. et al. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β-cells by protein serotonylation. – PLos Biol., **7**, 2009, № 10, e1000229.
62. Pazos, A., A. Probst et J. Palacios. Serotonin receptors in the human brain III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. – Neuroscience, **21**, 1987, № 1, 97-122.
63. Pazos, A., A. Probst et J. Palacios. Serotonin receptors in the human brain IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. – Neuroscience, **21**, 1987, № 1, 123-139.
64. Pennings, E. et al. Tryptophandecarboxylase from Catharnthus roseus is pyridoxo-quinoprotein. – FEBS Lett., **255**, 1989, № 1, 97-100.
65. Pozo, D. et al. mRNA expression of nuclear receptor PZR/RORα, melatonin membrane receptor MT, and hydroxyindole-O-methyl transferase in different populations of human immune cells. – J. Pineal Res., **37**, 2004, № 1, 48-54.
66. Rapport, M., A. Green et E. Page. Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterization. – J. Biol. Chem., **176**, 1948, 1243-1251.
67. Ray, T. Psychedelics and the human receptorome. – PLoS ONE, **5**, 2010, № 2, e9019.
68. Reiter, R. Melatonin in the context of the reported bioeffects of environmental electromagnetic fields. – Bioelectrochemistry and Bioenergetics, **47**, 1998, № 1, 135-142.
69. Revial, G. et al. Aromatization of 1,6,7,7a-tetrahydro-2H-indol-2-ones by a novel process. Preparation of key-intermediate methyl 1-benzyl-5-methoxy-1H-indole-3-acetate and the syntheses of serotonin, melatonin and bufotenin. – J. Org. Chem., **67**, 2002, № 7, 2252-2256.
70. Reppert, S., D. Weaver et T. Ebisawa. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. – Neuron, **13**, 1994, 1177-1185.
71. Reppert, S. et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 1995, 8734-8738.
72. Rodriguez, I. et al. Structural analysis of the human hydroxyindol-O-methyl transferase gene. Presence of two distinct promoters. – J. Biol. Chem., **269**, 1994, № 50, 31969-31977.
73. Saito, K. et al. Determination of psilocin in magic mushrooms and rat plasma by liquid chromatography with elctrospray ionazition mass spectrometry. – Analytica Chimica Acta, **527**, 2004, 149-156.
74. Saito, K. et al. Determination of psilocybin in hallucinogenic mushrooms by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. – Talanta, **66**, 2005, 562-568.
75. Sanger, G. J. 5-Hydroxytryptamine and the gastrointestinal tract: where next? – Trends Pharmacol. Sci., **29**, 2008, № 9, 465-471.
76. Sard, H. et al. SAR of psilocybin analogs: Discovery of a selective 5-HT_{2C} agonist. – Bioorg.&Med. Chem. Lett., **15**, 2005, 4555-4559.
77. Sato, T. et al. Characterization of tryptophan hydroxylating enzyme from malignant mouse mast cell. – Eur. J. Pharmacol., **1**, 1967, 18-25.
78. Shimpo, M. et al. Serotonin inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells stimulated wit interleukin-1. – Eur. J. Pharmacol., **338**, 1997, № 1, 97-104.
79. Shoeffter, P. et D. Hoyer. Is the sumatriptan induced endothelium-dependent relaxation of pig coronary arteries mediated by 5-HT_{1D} receptors? – Eur. J. Pharmacol., **166**, 1989, № 1, 117.
80. Shulgin, A. Profiles of psychedelic drugs 8. Psilocybin. – J. psychedelic drugs, **12**, 1980, 79.
81. Shulgin, A. et A. Shulgin. TIHKAL. The continuation. – Transform press, Berkeley, CA, 1997.
82. Sicsic, S. et al. Three-dimensional quantatuve structure-activity relationship of melatonin receptor ligands: a comparative molecular field analysis study. – J. Med. Chem., **40**, 1997, № 5, 739-748.
83. Speeter, M. et W. Anthony. The action of oxalyl chloride on indoles: a new approach to tryptamines. – J. Am. Chem. Soc., **76**, 1954, № 23, 6208-6210.
84. Stromberg, V. The isolation of bufotenine from Piptadenia peregrina. – J. Am. Chem. Soc., **76**, 1954, 1707.
85. Szmuszkovicz, J., W. Anthony et R. Heinzelman. Synthesis of N-acetyl-5-methoxytryptamine. – J. Org. Chem., **25**, 1960, № 5, 857-859.
86. Tan, D. et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. – BBRC, **253**, 1998, № 3, 614-620.
87. Tsotinis, A. et al. Design, synthesis and melatoninergic activity of new azido- and isothiocyanato-substituted indoles. – J. Med. Chem., **50**, 2007, 6436-6440.
88. Vasilescu, D. et H. Broch. Quantum molecular modeling of melatonin. – Journal of Molecular Structure (Theochem), **460**, 1999, 191-205.
89. Veenstra-VanderWeele, A., G. Anderson et E. Cook. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. – Eur. J. Pharmacol., **410**, 2000, 165-181.
90. Walter, D. et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet α-granule release. – Cell, **115**, 2003, № 7, 851-862.

✉ **Адрес за кореспонденция:**
Е. Игов
Катедра "Фармацевтична химия"
Фармацевтичен факултет
Медицински университет
Ул. „Дунав" № 2
1000 София

✉ **Address for correspondence:**
E. Igov
Department of Pharmaceutical Chemistry
Faculty of Pharmacy
Medical University
2 Dunav str.
1000 Sofia