

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Antidepressivum paroxetin a jeho příprava

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: RNDr. Jan Veselý, PhD.

PRAHA 2009

JIŘÍ SCHIMER

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE

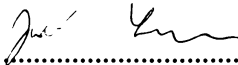


3233148820

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové DrSc a konzultanta RNDr. Jana Veselého PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 3. 6. 2009



.....

Jiří Schimer

Poděkování

Chtěl bych především poděkovat své vedoucí práce Prof. Marii Stiborové, DrSc., že mi umožnila tuto organicko-biochemickou práci uskutečnit. Můj největší dík patří RNDr. Janu Veselému, PhD., který mě zasvětil do práce v laboratoři, byl trpělivý, přestože to bylo často se mnou těžké, a vždy měl připravenou nejednu cennou radu. Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům především za zázemí, které mi poskytli, ale také za opravení nespočetných gramatických chyb v tomto textu, své přítelkyni Janě Písačkové, za podporu, kterou mi po celou dobu mého psaní poskytovala a za pomoc při formulování vět, které byly pro mě obtížně formulovatelné.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Simoně Hybelbauerové, která mě proškolila v měření NMR spekter, RNDr. Ivaně Císařové, Csc, za provedení rentgenové strukturní analýzy a její interpretaci, RNDr. Stanislavu Hilgardovi, CSc. za měření IČ spekter a jejich interpretaci, RNDr. Martinu Štíchovi za měření a interpretaci hmotnostních spekter a Mgr. Bohunce Šperlichové za měření optických rotací a bodů tání.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, že poskytlo finanční podporu na tento projekt (výzkumný záměr MSM0021620857).

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	5
1. Úvod.....	7
2. Úvod do problematiky	8
2.1 Nervová synapse	8
2.1.1 Chemická synapse.....	8
2.1.2 Uvolnění neurotransmiteru	9
2.1.3 Neurotransmitery	10
2.1.4 Účinek neurotransmiterů v synaptické šterbině.....	11
2.1.5 Odstraňování neurotransmiteru ze synaptické šterbiny	12
2.2 Depresivní onemocnění	14
2.2.1 Typy depresivních onemocnění	15
2.2.2 Diagnóza depresivního onemocnění	16
2.2.3 Prevalence depresivního onemocnění.....	17
2.3 Příčiny depresivního onemocnění	18
2.3.1 Sociální faktory	18
2.3.2 Genetická predispozice	19
2.3.3 Biochemické hypotézy depresivního onemocnění.....	20
2.3.3.1 Monoaminová hypotéza.....	20
2.3.3.2 Neurotrofická hypotéza.....	21
2.3.3.3 Hypotéza narušení hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy.....	23
2.3.3.4 Epigenetická hypotéza.....	25
2.4 Léčba depresivních onemocnění	27
2.4.1 Léčba psychoterapií	28
2.4.2 Léčba pomocí elektrokonvulsivní terapie	29
2.4.3 Léčba pomocí antidepresiv	29
2.4.3.1 Inhibitory monoaminoxidas (MAOI).....	30
2.4.3.2 Tricyklická antidepresiva (TCA).....	31
2.4.3.3 Selektivní inhibitory zpětného „vychytávání“ serotoninu (SSRI).....	32
2.4.3.4 Další antidepresiva.....	33
2.4.3.5 Porovnání komerčně dostupných antidepresiv.....	33
2.4.3.6 Paroxetin.....	34
2.5 Přírodní látky jako léčiva	34
2.6 Totální syntéza přírodních látek.....	35
2.6.1 Asymetrická organokatalýza.....	36
2.6.1.1 Enaminová aktivace.....	37
2.6.1.2 Iminiová aktivace.....	39
2.6.1.3 SOMO aktivace.....	40
3. Cíle práce	42
4. Materiál a metody	43
4.1 Použitý materiál	43
4.1.1 Chemikálie	43
4.1.2 Separční materiály.....	44
4.1.3 Použité přístroje	44

4.2 Metody	45
4.2.1 NMR spektroskopie	45
4.2.2 Sloupcová chromatografie	46
4.2.3 Tentkovrstevná chromatografie (TLC).....	46
4.2.4 Krystalizace	47
4.2.5 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)	47
4. Výsledky	48
5. Diskuse	59
6. Závěr	61
7. Použitá literatura	62

SEZNAM ZKRATEK

5-HT	serotonin [5-hydroxytryptophan]*
5-HTT	serotoninový přenašeč [5-hydroxytryptophan transporter]
5-HTTLPR	polymorfni oblast genu kódující přenašeč pro serotonin [serotonin-transporter-linked polymorphic region]
5-TR2A	serotoninový receptor 2A [5-hydroxytryptophan receptor 2A]
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ATP	adenosin trifosfát
AVP	arginin vasopresin
BDNF	mozkový neurotrofický faktor [brain-derived neurotrophic factor]
C	cytosin
CaM kinasa	kinasa závislá na kalmodulinu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
CREB	transkripční jaderný faktor [cAMP response element binding protein]
CRH	kortikoliberin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSM-IV	diagnostická klasifikace poruch a nemocí 4. edice [Diagnostic Statistical Manual IVth edition]
G	guanin
GABA	kyselina γ -amino máselná
HAM-D	Hamiltonova škála depresivního onemocnění
HAT	acetyltransferasy acetylující histony [histon acetyltransferase]
HDAC	acetyltransferasy deacetylující histony [histon deacetyltransferase]
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital [lowest unoccupied molecular orbital]
MADRS	škála deprese Montgomeryho a Asberga
MAO	monoaminoxidasa
MAOI	inhibitory monoaminoxidas
MeCP2	methyl-CpG vázající protein
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina [messenger ribonucleic acid]
NaSRI	inhibitory zpětného „vychytávání“ noradrenalinu a serotoninu [noradrenalin and serotonin reuptake inhibitor]
NMR	nukleární magnetická resonance
SIN3A	SIN3 homolog A

* v hranatých závorkách jsou uvedeny anglické ekvivalenty

SNRI	selektivní inhibitory zpětného „vychytávání“ noradrenalinu [selective noreadrenalin re-uptake inhibitor]
SOMO	molekulový orbital obsazený jedním elektronem [single occupied molecular orbital]
SSRI	selektivní inhibitory zpětného „vychytávání“ serotoninu [selective serotonin re-uptake inhibitor]
TCA	tricyklická antidepresiva
TLC	tenkovrstevná chromatografie
Trk B	tropomyosinkinasa B
vs.	versus
WHO	Světová zdravotnická organizace [World Health Organisation]

1. Úvod

V ekonomicky vyspělých zemích světa trpí vážnou formou depresivního onemocnění (trvajících alespoň 30 dní) 4,9 % osob [1]. Do roku 2020 se podle některých odhadů depresivní onemocnění stanou druhým nejčastějším zdravotním problémem na celém světě hned po onemocněních srdce a cév [2]. WHO depresi definuje takto: „Deprese je častou duševní poruchou projevující se depresivní náladou, ztrátou zájmu a radosti, pocitem viny a nízkou sebeúctou, ztrátou chuti k jídlu, neklidným spánkem, ztrátou energie a neschopností se soustředit. Tyto problémy se mohou opakovat a mohou vést až k neschopnosti jedince vykonávat každodenní povinnosti. Nejvážnější formy deprese mohou vést až k sebevraždě“ [3].

Depresivní onemocnění pacientům snižuje kvalitu života a při jeho vážnějších formách je nutná i hospitalizace. Ekonomické ztráty způsobené častým výskytem depresivních onemocnění a náklady na jejich léčbu zatěžují celosvětovou ekonomiku. Ve Spojených státech amerických byl proveden výzkum, který na tyto ztráty poukázal. Podle tohoto výzkumu dosahují 77,4 miliard dolarů za rok 1990 a 83,1 miliard dolarů za rok 2000 [4].

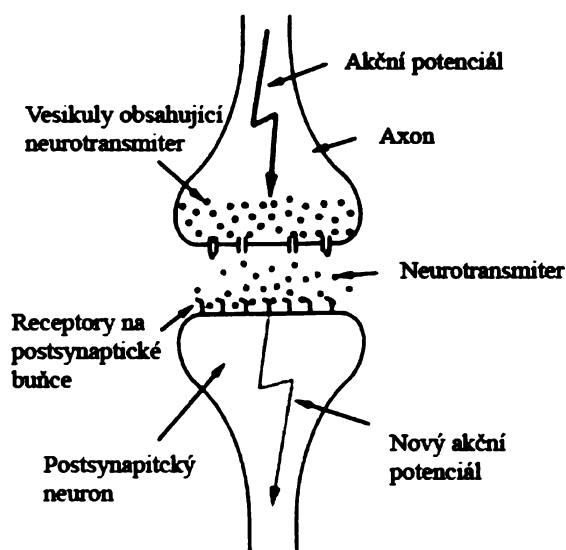
První zmínky o depresivní náladě, tehdy nazývané melancholií, jsou již v Hippokratově knize Aforismů [5]. Léčba depresivních onemocnění se ovšem objevuje mnohem později, a to v 19. století [6]. V té době ovšem nebylo známo prakticky nic o příčinách, průběhu ani o biologické podstatě depresivních onemocnění.

Je nepochybné, že uvedení nových antidepressiv na trh, popřípadě zjednodušení syntézy stávajících, by bylo velice žádoucí, ať již proto, že by napomohlo zmírnit utrpení značného a stále rostoucího počtu pacientů, či proto, že by odlehčilo zátěž světové ekonomiky.

2. Úvod do problematiky

2.1 Nervová synapse

Synapse jsou speciální spoje, pomocí nichž neurony komunikují mezi sebou nebo s jinými buňkami, například svalovými. Běžný neuron vytváří zhruba 1000 synaptických spojení a zároveň je na něm zakončeno 10 000 spojení z jiných neuronů. Signál přenášen nervovým vláknem ve formě elektrického potenciálu na membráně je přenášen na další neuron přes extracelulární prostor nazývaný nervová synapse. Synapse může buď přenášet elektrický signál pomocí chemických sloučenin (synapse chemická obr.1), nebo jej může přenášet přímo (synapse elektrická). Většina synapsí je chemických a propojují axon a dendrit. Při depresivním onemocnění a jeho léčení dochází ke změnám především na chemických synapsích, proto jsou následující kapitoly věnovány právě jim [7].



Obr.1 Schematické znázornění chemické synapse. Akční potenciál vyvolá uvolnění neurotransmiteru do synaptické štěrbině. Ten se váže na postsynaptické receptory a způsobí otevření iontových kanálů na postsynaptické buňce, což má za následek vznik akčního potenciálu. Převzato a upraveno podle [8]

2.1.1 Chemická synapse

Chemickou synapsi dělíme na tři části: presynaptickou část, synaptickou štěrbinu a postsynaptickou část. Presynaptická část je buňka, na které akční potenciál vyvolá uvolnění neurotransmiterů do synaptické štěrbině. Tato štěrbinu je zhruba 20-40 nm široká. Neurotransmitery jsou malé chemické sloučeniny, které se váží především na

receptory postsynaptické buňky, tedy buňky, na niž se signál přenáší. Jsou uchovávány v malých transportních váčcích neboli vesikulech (obr. 2). Přenos signálu je jednosměrný, signál lze přenášet pouze z buňky presynaptické na buňku postsynaptickou [7].



Obr.2: Nervová buňka. Snímek z elektronového mikroskopu znázorňující dvě nervové synapse (tmavě orámované části plasmatické membrány v dolní části snímku). Velké černé struktury jsou mitochondrie, velké množství malých váčků jsou vesikuly naplněné neurotransmitery. Černé šipky ukazují část zvanou aktivní zóna, místa, kde jsou přítomny vesikuly v hojném počtu a jsou připraveny na splnutí s membránou. Převzato z [7].

2.1.2 Uvolnění neurotransmiteru

Uvolňování neurotransmiteru do synaptické štěrbiny nejčastěji probíhá pomocí exocytosis. Exocytosa je spuštěna kaskádou začínající depolarizací membrány způsobenou akčním potenciálem. Tato depolarizace způsobí zvýšení prostupnosti vápenatých iontů přes membránu, což zvýší celkovou koncentraci těchto iontů uvnitř v terminální části axonu. Zvýšení koncentrace vápenatých iontů v buňce má za následek fosforylaci proteinu synapsin (pomocí druhého posla cAMP a kinasy závislé na kalmodulinu (CaM kinasy II), který zajišťuje, aby byl vesikul v blízkosti membrány, ale

zároveň zabraňuje jeho fúzi s membránou. Toto místo se nazývá aktivní zóna (obr. 2 str. 9). Právě malá vzdálenost vesikulů od membrány umožňuje předání signálu velikou rychlostí (řádově stovky μs) [9]. Synapsin se skládá ze dvou částí: hydrofobní části nazývané hlava a bazické části nazývané ocas. Hlava zprostředkovává vazbu mezi synapsinem a transportním vesikulem a ocas zprostředkovává vazbu mezi synapsinem a aktinovými vlákny, které jsou blízko buněčné membrány (aktivní zóna). Při fosforylaci dochází k oslabení vazby mezi aktinem a synapsinem a dochází ke splynutí vesikulu s membránou a k uvolnění neurotransmiteru do synaptické štěrbině [10]. Závislost koncentrace vápenatých iontů na množství uvolněného neurotransmiteru není lineární, ale exponenciální. Malá změna koncentrace vápenatých iontů tedy způsobí velkou změnu v množství vyplaveného neurotransmiteru [11].

Uvolňování neurotransmiteru je regulováno pomocí presynaptických receptorů. Receptory jsou citlivé buď přímo na neurotransmiter, který buňka sama uvolňuje do okolí (autoreceptory), nebo na neurotransmiter vyplavovaný buňkami v blízkém okolí (heteroreceptory). Tyto presynaptické receptory zprostředkovávají zpětnovazebnou inhibici při uvolňování neurotransmiteru. Receptory mohou ovlivňovat množství uvolněného neurotransmiteru třemi způsoby:

- Inhibicí vápenatých kanálů. Zabráněním (částečným nebo úplným) průchodu vápenatých iontů přes membránu nedojde k zvýšení těchto iontů v aktivní zóně, což způsobí menší uvolnění neurotransmiteru do synaptické štěrbině.
- Aktivací draselných a chloridových kanálů, čímž dojde k uvolnění velkého množství draselných iontů do extracelulárního prostoru. Oslabí se tak účinek akčního potenciálu a tím se zeslabí přenos signálu.
- Ovlivnění komplexu se synapsinem. Presynaptické receptory mohou ovlivnit vazbu mezi synapsinem a vesikulem [12].

2.1.3 Neurotransmitery

Neurotransmitery jsou chemická individua, pomocí nichž se přenáší signál mezi nervovými buňkami nebo mezi nervovou buňkou a jinou cílovou buňkou (například svalovou). Neurotransmitery mohou fungovat jak inhibičně tak excitačně, to znamená, že

mohou na cíleném neuronu akční potenciál buď vyvolávat, nebo naopak utlumovat. To, zda bude neurotransmitter inhibovat nebo excitovat, nezávisí na neurotransmitteru, ale na receptorech, které jsou na povrchu cílové buňky v synaptické štěrbině. Některé neurotransmitery mají ovšem především receptory inhibiční, a proto mají většinou inhibiční efekt (např. noradrenalin), na druhou stranu jiné mají především excitační efekt (např. glutamát) [13].

Neurotransmitery můžeme rozdělit do dvou skupin: na neurotransmitery klasické a ostatní.

Klasické neurotransmitery jsou syntetizovány v neuronu, musí být přítomny v synaptickém zakončení, chemicky stejný exogenní neurotransmitter musí vyvolat stejný efekt jako endogenní a musí existovat způsob odstranění neurotransmitteru ze synaptické štěrbině. Do této skupiny patří katecholaminy - dopamin, adrenalin, noradrenalin (deriváty tyrosinu), serotonin (derivát tryptofanu), acetylcholin (derivát cholinu), glutamát a kyselina γ -amino máselná (GABA) a další [13].

Ostatní neurotransmitery nesplňují alespoň jednu z uvedených podmínek - jedná se o peptidové neurotransmitery (například neuropeptid Y) a o plynné neurotransmitery (například oxid dusnatý nebo oxid uhelnatý) [14].

2.1.4 Účinek neurotransmiterů v synaptické štěrbině

Neurotransmitery se v synaptické štěrbině vážou na receptory umístěné jak na postsynaptické tak na presynaptické buňky. Presynaptické receptory zprostředkovávají zpětnovazebnou inhibici uvolňování neurotransmiterů. Postsynaptické receptory po navázání neurotransmitteru zajišťují otevření iontových kanálů. Otevření iontových kanálů vede k průtoku iontů do buňky (excitační signál - například Na^+) nebo z buňky (inhibiční signál - například K^+) po koncentračním spádu. Otevřením několika kanálů pro sodíkové ionty během krátkého času dojde ke zvýšení koncentrace a to vede k depolarizaci membrány a vzniku akčního potenciálu.

Všechny receptory mají společné dva rysy:

- Jedná se o membránové proteiny, na jejichž extracelulární část se váže neurotransmitter.

- Vykonávají efektorové funkce v cílové buňce, např. otevírají iontové kanály. Otevírání iontových kanálů zprostředkovávají receptory přímo (receptor je i iontový kanál) nebo nepřímo (otevření iontových kanálů je zprostředkováno druhými posly) [7].

2.1.5 Odstraňování neurotransmiteru ze synaptické štěrbině

Odstraňování neurotransmiteru ze synaptické štěrbině je důležitým procesem, aby se mohl přenos signálu co nejdříve opakovat. Neurotransmitter je ze synaptické štěrbině odstraňován třemi možnými způsoby:

- Zpětným „vychytáváním“ neurotransmiteru presynaptickou buňkou (serotonin, dopamin), případně buňkami gliovými.
- Enzymovým štěpením (acetylcholin).
- Prostou difuzí (některé peptidové neurotransmitery [7]) [15].

Difuze se alespoň částečně podílí na odstranění všech typů neurotransmiterů. Je však příliš pomalá a důležitou roli hraje jen u některých peptidových neurotransmiterů [15].

Nejčastějším způsobem odstraňování neurotransmiteru ze synaptické štěrbině je jeho zpětné „vychytávání“ neurotransmitterovými přenašeči presynaptických buněk nebo gliových buněk. Jako první bylo objeveno zpětné „vychytávání“ noradrenalinu. Záhy bylo zjištěno zpětné „vychytávání“ i dalších neurotransmiterů (GABA, serotonin, glycin, glutamát), ale nepodařilo se prokázat zpětné „vychytávání“ acetylcholinu (ten je v synaptické štěrbině odbouráván). Po zpětném vychytání do intracelulárního prostoru jsou neurotransmitery dále přeneseny do vesikulů nebo jsou degradovány [16].

Neurotransmitterové přenašeče můžeme rozdělit podle místa účinku do dvou nadrodin: přenašeče umístěné na plazmatické membráně a přenašeče umístěné na membráně vesikulů. Každou z těchto nadrodin dále dělíme do dvou rodin: podle iontu potřebného k přenosu neurotransmiteru, na přenašeče závislé na Na^+/Cl^- (obr. 3 str. 13) a na přenašeče závislé na Na^+/K^+ [16].

Hnací silou všech přenašečů závislých na Na^+/Cl^- je Na^+ koncentrační gradient. Na^+ a Cl^- jsou přenášeny symportem spolu s neurotransmitterem. Energie, která je vynaložena

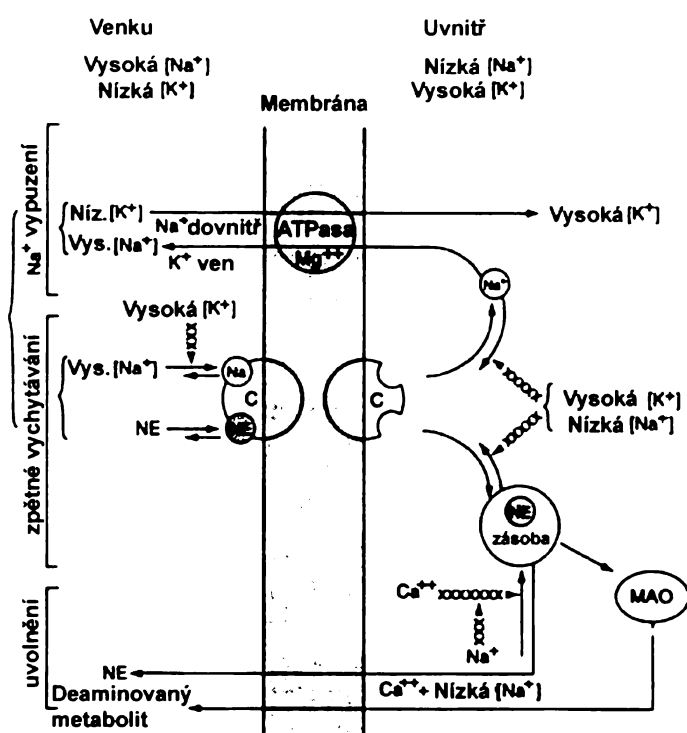
na přenos neurotransmiteru, je téměř všechna získána z přenosu sodíkového iontu. Sodíkové ionty jsou poté zpětně čerpány do extracelulárního prostoru pomocí sodno-draselné pumpy za spotřeby ATP (obr. 3 str. 14). Přenašeče závislé na Na^+/Cl^- přenášejí většinu neurotransmiterů jako je serotonin, noradrenalin, GABA, dopamin a další. Každý ze jmenovaných neurotransmiterů má svůj vlastní přenašeč a mezi těmito přenašeči byla zjištěna vysoká homologie (40-60 %) [17]. Jednotlivé přenašeče ovšem nepřenášejí pouze jeden neurotransmitter, ale mají podobnou afinitu i k dalším neurotransmiterům, například přenašeče pro dopamin a noradrenalin mohou přenášet oba substráty s podobnou afinitou ($K_m \sim 1 \mu\text{mol}$) [18]. Afinita přenašečů je ke svým substrátům různá - od 320 nM až do 930 μM . Aktivita přenašečů je regulována jejich fosforylací a defosforylací [19].

Přenašeče závislé na Na^+/K^+ přenášejí v centrální nervové soustavě (CNS) především L-glutamát. Glutamát zastává v CNS především excitační funkci. Tento typ přenašeče udržuje extracelulární koncentraci glutamátu menší než 1 μM [20]. Nebyl zatím nalezen žádný vliv tohoto neurotransmiteru na depresivní onemocnění.

Přenesený neurotransmitter je dále v intracelulárním prostoru přenesen do vesikulu, aby mohl být znovu použit k signalizaci. Hromadění neurotransmiteru ve vesikulu má dvojí úlohu:

- Snížení degradačního procesu molekuly v cytoplasmě, například katecholaminy či serotonin jsou oxidačně deaminovány v cytoplasmě pomocí enzymu monoaminoxidasy.
- Udržení nízké cytoplasmatické koncentrace neurotransmiterů je zcela nezbytné, aby koncentrace nedosáhla kritické meze, při níž by neurotransmitter mohl začít být toxický.

Přenašeče, které jsou zodpovědné za transport přes membránu vesikulů, používají energii k přenosu ve formě vodíkového gradientu. Tento vodíkový gradient je uvnitř vesikulu vytvářen H^+ pumpou, jež přenáší z intracelulárního prostoru do prostoru vesikulu vodíkové ionty za spotřeby ATP [17].



Obr. 3 Zpětné „vychytávání“ neuro-transmiteru. V horní části obrázku vidíme sodno-draselnou pumpu, která zajišťuje vysokou koncentraci draselných iontů a nízkou koncentraci sodných iontů v intracelulárním prostoru a zároveň vysokou koncentraci sodných a nízkou koncentraci draselných iontů v prostoru extracelulárním. Uprostřed můžeme pozorovat přenašeč, který synportem přenáší

neurotransmitter (noradrenalin) se sodíkovým iontem. Neurotransmitter se dále přesouvá do vesikulu. Je zde naznačena také degradační cesta neurotransmiteru enzymem monoaminoxidasou. Převzato a upraveno podle [16]

2.2 Depresivní onemocnění

Depresivní onemocnění je vážná psychická porucha, která během života zasáhne zhruba každého pátého jedince. U poloviny z těchto osob ovšem není depresivní onemocnění diagnostikováno a nemůže být léčeno. Jedná se o komplexní onemocnění, jež ovlivňuje jak psychický tak fyzický stav jedince. Příčiny depresivního onemocnění zatím nejsou známy, ale depresivní onemocnění vzniká pravděpodobně jako důsledek kombinace biologických faktorů, vlivů okolního prostředí a psychického stavu jedince [21, 22].

Pojem deprese má více významů; může to být symptom (smutná nálada), syndrom (skupina příznaků) nebo psychické onemocnění. Všechny tyto termíny jsou platné a vyjadřují různé věci. V této práci bude používán výhradně termín depresivní onemocnění, aby nedošlo k záměně pojmů.

K nejednoznačnosti přispívá také další dělení deprese na různé typy a podtypy. Vědecká a lékařská společnost však nebyla schopna se dohodnout na jednotném dělení. Jako příklad lze uvést dělení depresivního onemocnění na depresivní onemocnění reaktivní, tj. deprese vyvolaná silným stresem, a endogenní, tj. onemocnění způsobené špatnou regulací na molekulární úrovni. Toto rozdělení ovšem uznává jen část lékařů, jiní jej odmítají. Americká psychiatrická společnost vydala sadu definic popisující jednotlivé typy depresivního onemocnění s názvem „Diagnostická klasifikace poruch a nemocí 4. edice“ (*Diagnostic Statistical Manual IVth edition; DSM-IV*). Tento soubor představuje pokus o taxonomické zařazení jednotlivých psychických onemocnění a jejich typů. Je ovšem důležité podotknout, že tento taxonomický systém není pevně stanovený jako je například taxonomie živočichů, ale velice rychle se mění. Dělení depresivních onemocnění podle DSM (III a IV) je pravděpodobně nejpoužívanější a nejuznávanější dělení, a proto jsou v této práci rozdělena depresivní onemocnění podle této příručky [21].

2.2.1 Typy depresivních onemocnění

Unipolární deprese

Při unipolární depresi trpí pacient jednou či více depresivními epizodami. Depresivní epizoda je definována jako období, při kterém jedinec vykazuje po dobu 14 dnů alespoň jeden ze dvou zásadních projevů: depresivní náladu nebo ztrátu radosti z věcí, které ho dříve těšily. Dále musí pacient vykazovat alespoň 4 z následujících symptomů: změnu chuti k jídlu nebo změnu váhy, psychomotorickou retardaci, poruchy spánku, ztrátu energie, pocity viny a méněcennosti, neschopnost soustředit se, myšlenky na sebevraždu [21].

Dystymie

Dystymie je slabší chronické depresivní onemocnění, které přetrvává alespoň 2 roky. Má stejné příznaky jako unipolární deprese, ale projevují se mnohem slaběji. Často se také u pacientů trpících tímto onemocněním projevují pocity prázdnoty, osamělosti,

chronické nudy, pocity, že jim druzí lidé nerozumějí a nedokážou naplnit jejich emociální nároky. Naopak nebývá častá psychomotorická retardace a snížená chuť k jídlu. Pacienti jsou většinou schopni vykonávat potřeby každodenního života, i když je to stojí značné úsilí [23].

Bipolární deprese

Bipolární depresivní onemocnění je takové onemocnění, při kterém se střídá depresivní nálada s náladou maniakální. Maniakální nálada trvá alespoň jeden týden. Jedinec se při ní vyznačuje buď značně zlepšenou či povznesenou náladou, anebo je vznětlivý. Dále je často diagnostikována snížená potřeba spát, upovídanost, nápaditost, promiskuita, optimismus a zvýšené sebevědomí. Bipolární depresi rozdělujeme na dva typy (bipolární deprese I a II). Pacient trpí bipolární depresí I. typu, když se u něj vyskytne jedna či více depresivních epizod a jedna epizoda maniakální či smíšená. Při smíšené epizodě prožívá pacient současně depresivní i maniakální epizodu. Bipolární deprese II. typu je taková deprese, kdy pacient prožil jednu či více depresivních epizod a jednu epizodu hypomaniakální. Hypomaniakální epizoda má stejné příznaky jako maniakální, ale trvá kratší dobu (4 dny) [21, 22].

Cyklotymie

Cyklotymie je onemocnění, při kterém se střídají hypomaniakální epizody s epizodami depresivními (slabými) po dlouhou dobu, většinou alespoň dva roky. Jedná se tedy o chronické onemocnění jako u dystymie. Stejně jako u dystymie jsou pacienti schopni vykonávat činnosti spojené s potřebami každodenního života [21].

2.2.2 Diagnóza depresivního onemocnění

Zatím neexistuje žádný laboratorní test, který by diagnostikoval depresivní onemocnění. Depresivní onemocnění by mělo být diagnostikováno specialistou v oboru, který depresivní onemocnění diagnostikuje na základě symptomů, jež pacient uvádí. Jelikož se depresivní onemocnění diagnostikuje až poté, co pacient sám poukáže na

symptomy, velká část (zhruba polovina) případů se nepodaří diagnostikovat [24]. Psycholog nebo psychiatr stanoví diagnózu na základě zkušeností a pomocí manuálu diagnostické klasifikace poruch a nemocí (DSM-IV). Také je možné provést diagnosu pomocí již dobře zaběhnutého systému testů. Tyto testy jsou soubory otázek, které jsou položeny tak, aby odhalily možné psychické onemocnění. Nejběžnějšími testy jsou Hamiltonova škála depresivního onemocnění (HAM-D), škála deprese Montgomeryho a Asberga (MADRS) a u starších lidí geriatrická škála depresivního onemocnění dle Yessavage [25]. HAM-D test se často také používá k určení závažnosti onemocnění podle toho, kolika bodů pacient v tomto testu dosáhl. Existuje celá řada dalších testů, ale pro tuto práci nejsou důležité.

2.2.3 Prevalence depresivního onemocnění

Různé literární zdroje uvádějí různou prevalenci, která se mění v závislosti na věku pacientů, místa studie, velikosti zkoumaného vzorku, typu stanovení diagnózy atd. Optimistické zdroje [26] uvádějí zhruba 1,56 % (1,1 % u mužů a 1,98 % u žen) trpících depresivním onemocněním, méně optimistické zdroje [27] uvádějí zhruba 10 % (7,1 % u mužů a 12,5 % u žen). Množství jedinců, kteří během svého života onemocní depresí, je podstatně vyšší a pohybuje se od 17,1 % (12,7 % u mužů a 21,3 % u žen) do 25,1 % (20,3 % u mužů a 30,5 % u žen) podle místa zkoumání [21, 26, 28, 29].

Na první pohled je zřejmé, že depresivním onemocněním trpí mnohem více žen než mužů. V jedné z největších studií týkající se prevalence depresivního onemocnění u mužů a žen [27], které se zúčastnilo 27 000 pacientů z 15 zemí světa (ze všech kontinentů a ras), vyšlo jasně najevo, že ženy jsou náchylnější k depresivnímu onemocnění než muži. Poměr v těchto 15 zemích mezi nemocnými ženami a nemocnými muži byl mezi 1,3 a 2,8 [27]. Mnoho dalších studií tento fakt potvrzuje [30, 31].

Existuje celá řada teorií, proč jsou ženy náchylnější k depresivnímu onemocnění než muži. Bebbington ve své práci [32] předpokládá, že rozdíl v počtu depresivních onemocnění mezi ženami a muži je způsoben především zklamáním v manželství (nesplněním očekávání). Jiní se snaží tento rozdíl vysvětlit větším počtem některých stresových situací (prožitek porážky, ponížení) v životě [33] anebo menší schopností se vyrovnat se stresovými situacemi [34]. Některé studie se snažily vysvětlit rozdíl pomocí

rozdílné genetické informace, zatím ovšem neúspěšně [35]. Hormony pohlavních žláz pravděpodobně hrají jistou roli při depresivním onemocnění, ať již účinkem na hypothalamo-hypofýzo-nadledvinovou osu, která je poté špatně regulována [36], nebo účinkem hormonů na serotogenní systém [37]. Rozhodující faktory způsobující tak velký rozdíl mezi počtem nemocných mezi muži a ženami ovšem ještě nebyly objeveny.

Důležité je také podotknout, že starší lidé trpí depresivním onemocněním častěji než jedinci mladší [25].

2.3 Příčiny depresivního onemocnění

Skutečná podstata depresivního onemocnění není prakticky dodnes známa. Ve světové vědecké komunitě panoval obecně dlouhé roky rozpor, zda je depresivní onemocnění důsledkem různých biologických faktorů nebo společenského vlivu a stresu z okolí. V posledních letech se vědecko-lékařské kruhy spíše přiklání k názoru, že obě dvě složky hrají stejně důležitou roli a spojují je v teorii zvané „diathesis–stress model“ [38]. Velice důležitým faktorem je také psychický stav pacienta, jenž může ovlivňovat depresivní onemocnění. Lidé, kteří mají nízké sebevědomí a jsou pesimističtí, mají všeobecně větší sklon k depresivnímu onemocnění. Také léčba jim trvá déle. Je všeobecně známo, že psychika může ovlivnit průběh mnoha onemocnění a depresivní onemocnění samozřejmě není výjimkou [39].

2.3.1 Sociální faktory

Velké množství sociálních vlivů je uváděno jako možná příčina depresivních onemocnění. Stres je považován za jeden z nejdůležitějších faktorů. U lidí vystavovaným častému nadměrnému stresu je častěji diagnostikováno depresivní onemocnění [40]. Pacienti často uvádějí sexuální zneužívání během dětství a fyzické či psychické týrání [41]. Další nemoci jako je rakovina [42] či kardiovaskulární potíže jsou mnohdy doprovázeny depresivním onemocněním [43]. Kardiovaskulární obtíže jsou spojovány s depresivním onemocněním již od 70. let minulého století, kdy bylo zjištěno, že pacienti trpící depresí mají vyšší úmrtnost na kardiovaskulární problémy než zdraví jedinci [43].

Nelze tedy v tomto případě říci, že by deprese pouze doprovázela kardiovaskulární potíže, ale jedná se o oboustrannou korelaci.

Vliv rodiny může být důležitým faktorem: rozpory mezi rodiči, hádky či nedostatek citu ve vztahu [44]; těhotenství a narození dítěte [45]; úmrtí v rodině nebo mezi přáteli [25] a mnohé další faktory jsou častými sociálními příčinami depresivního onemocnění. Původcem této psychické poruchy může být i řada dalších vlivů jako je rozvod, ztráta práce, ztráta majetku (např. při krádeži), či potíže se zákonem [46].

Stresové situace a různé vlivy z okolního prostředí mohou vést k depresivnímu onemocnění, ale rozhodují přitom i mnohé další faktory, jako je psychický stav osoby nebo biologické předpoklady pro vyvinutí této nemoci (viz. dále).

2.3.2 Genetická predispozice

Prevalence u pacientů vykazujících historii depresivního onemocnění v rodině je 38 % [29], porovnáme-li tento výsledek s prevalencí celkovou 20 %, je částečná dědičnost zřejmá. Studie zabývající se prevalencí depresivního onemocnění u adoptovaných jedinců nejsou dostatečně rozsáhlé a jsou nekonzistentní [47].

Mnoho genů je spojováno s dědičností depresivního onemocnění nebo s dědičností náchylnosti k depresivnímu onemocnění. Většina studií se zabývá geny kódující: serotoninový přenašeč, serotoninový receptor 2A (5-HTR2A), tyrosinhydroxylasu (enzym syntetizující dopamin), tryptofanhydroxylasu (enzym syntetizující serotonin), katechol-O-methyltransferasu (enzym katabolizující dopamin) a mozkový neurotrofický faktor (brain-derived neurotrophic factor;BDNF), [48].

Studie zohledňující gen pro serotoninový přenašeč poukazovaly na možnou krátkou formu alely v polymorfní oblasti genu kódující serotoninový přenašeč (5-HTTLPR). Krátká forma se odlišuje od delší ztrátou 44 párů basí. Jedinec s kratší alelou má méně často přepisovaný gen pro serotoninový přenašeč (5-HTT), což může vést k depresivnímu onemocnění. Mezi ním a krátkou alelou 5-HTTLPR existuje jednoznačné spojení [49]. Krátká alela však pravděpodobně nezpůsobuje depresivní onemocnění jako takové, ale spíše ovlivňuje reakci na stres. Jedinec se hůře vyrovnává se stresovými situacemi, což pravděpodobně sekundárně vede k vyvinutí depresivního onemocnění [50].

2.3.3 Biochemické hypotézy depresivního onemocnění

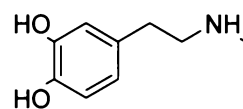
2.3.3.1 Monoaminová hypotéza

Monoaminová hypotéza vysvětluje depresi jako důsledek snížení aktivity některých neurotransmiterů (monoaminů) v mozku, hlavně dopaminu, noradrenalinu a serotoninu (obr. 4). Toto snížení aktivity je vysvětlováno především snížením koncentrací těchto neurotransmiterů v synaptické šterbině, způsobené nedostatečnou syntézou nebo příliš rychlou degradací neurotransmiterů, a zároveň nízkou senzitivitou postsynaptických receptorů k těmto neurotransmiterům [51].

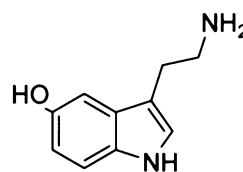
Tato hypotéza převládala od konce 50. do začátku 90. let minulého století a během těchto čtyřiceti let byla mnohokrát přeformulována. Hlavní argument potvrzující tuto hypotézu byl fakt, že všechna tehdy dostupná antidepresiva zvyšovala hladinu serotoninu, noradrenalinu nebo dopaminu v synaptické šterbině.

Druhým hlavním argumentem bylo depresivní chování objevující se při snížené koncentraci monoaminů v mozku [51]. Objevila se celá řada dalších argumentů potvrzujících tuto hypotézu. Například v mozkomíšním moku pacientů trpících depresivním onemocněním byla zjištěna snížená hladina kyseliny 5-hydroxy indoloctové (hlavního metabolitu serotoninu). U pacientů trpících depresivním onemocněním byla nalezena snížená koncentrace tryptofanu (prekurzor serotoninu) v plazmě. U pacientů léčených antidepresivy ovlivňujícími hladinu serotoninu byla tato koncentrace naopak vyšší, srovnatelná s plazmatickou koncentrací u zdravých jedinců. Koncentrace serotoninu a kyseliny 5-hydroxy indoloctové byla dále zjištěna nižší v tkáni mozku u pacientů, kteří spáchali sebevraždu [52].

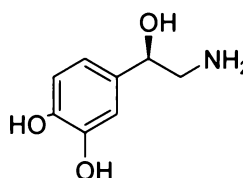
V polovině 90. let se začalo postupně od této hypotézy ustupovat, neboť nebyla schopna vysvětlit velké množství protiargumentů. Hlavním protiargumentem zpochybňujícím tuto hypotézu byl opožděný účinek antidepresiv. Zatímco inhibice monoaminoxidasy či jiné inhibice jsou pozorovatelné během několika minut, zlepšení psychického stavu je pozorovatelné až za několik týdnů [51]. Dalším nevysvětlitelným



Dopamin



Serotonin



Noradrenalin

Obr.4 Monoaminové neurotransmitery

faktem je neschopnost vyléčit 30 % veškerých pacientů trpících depresivním onemocněním pomocí psychofarmak ovlivňující hladinu monoaminů [53] a zároveň neschopnost této hypotézy vysvětlit způsob fungování antidepresiv neovlivňující tuto hladinu [54]. Například antidepresivum tianeptine účinkuje právě opačně než léky typu selektivních inhibitorů zpětného „vychytávání“ serotoninu (SSRI), tedy zvyšuje množství zpětně vstřebaného serotoninu [55]. Monoaminová hypotéza tedy musí být brána se značnou rezervou a někteří autoři ji dokonce považují za zcela překonanou [54]. Je ovšem důležité podotknout, že monoaminy (především serotonin a noradrenalin) hrají důležitou roli při depresivním onemocnění. Vlastní nedostatek nebo jejich malé množství není pravděpodobně příčinou onemocnění, ale jedná se pouze o jeden z jevů vyskytujících se u pacientů trpících depresivním onemocněním. Dnes se spíše vědci přiklánějí k myšlence, že zvýšená koncentrace monoaminů vyvolaná antidepresivy by mohla vést ke zvrácení neuroplastických změn neuronů (viz.dále), navozené změnou přepisu genů. Vlastní mechanismus však není dosud znám [56].

2.3.3.2 Neurotrofická hypotéza

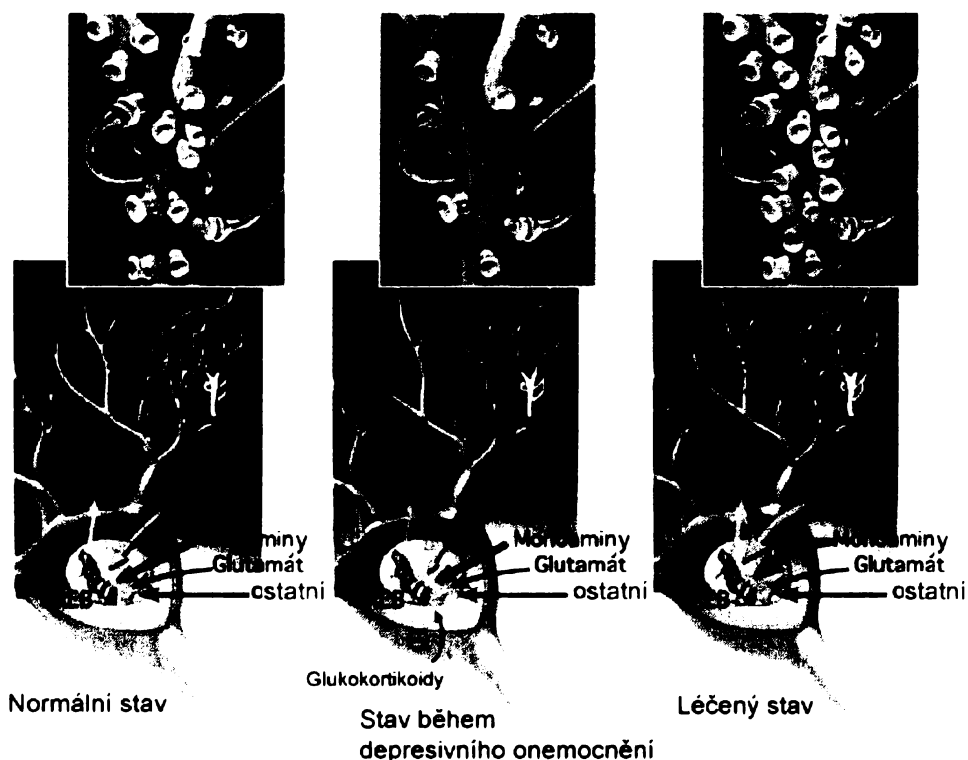
Neurotrofiny jsou signalizační faktory potřebné pro diferenciaci nevyvinutých neuronů a pro přežití neuronů již vyvinutých [57]. V posledních letech se ukázalo, že depresivní onemocnění může částečně vzniknout snížením hladiny neurotrofinů, což vede k odumírání neuronů, snižování počtu dendritů nebo ke změně neuroplasticity neuronů – snižování arborizace dendritů (větvení dendritů) (obr. 5 str. 23 a obr. 6 str. 25) [56]. Nejvíce zastoupeným neurotrofinem v mozku je BDNF [56]. Právě pokles tohoto faktoru je nejčastěji spojován s depresivním onemocněním a s neuronálními změnami. Léčba depresivních onemocnění pomocí antidepresiv (ale i pomocí elektrokonvulsivní terapie) zvyšuje intenzitu přepisování genu pro BDNF a jeho receptoru tropomyosin receptor kinasy B (Trk B) [58]. Zvýšení přepisu genu pro BDNF je mediováno transkripčním jaderným faktorem CREB (cAMP response element binding protein). CREB je protein, který se po fosforylaci váže na promotorová místa, čímž reguluje přepis genů [59]. Zvýšená exprese CREB v hipokampu je sama o sobě dostatečná pro snížení deprese [60]. Také pacienti léčení antidepresivy vykazují vyšší koncentraci proteinu CREB než

pacienti neléčení [61]. U pacientů, kteří spáchali sebevraždu, byla *post mortem* určena v mozku nižší koncentrace CREB [59].

Nejvyšší výskyt BDNF byl zaznamenán v hipokampu [62], který je často spojován s mnoha psychickými onemocněními [62], včetně depresivních [63]. U pacientů trpících depresivním onemocněním bylo pozorováno zmenšení hipokampu. Míra tohoto zmenšení byla úměrná délce a počtu epizod deprese [64]. Není ovšem známo, jestli dojde ke zmenšení hipokampu vlivem depresivního onemocnění nebo jestli zmenšený hipokampus zvyšuje pravděpodobnost výskytu tohoto onemocnění [65].

Antidepresiva indukují neurotrofický efekt, což má za následek navracení strukturních změn v hipokampu k normálu [66]. Tato hypotéza tedy také vysvětluje opožděný nástup účinku antidepresiv až po několika týdnech či měsících. Také po přímé aplikaci BDNF do středního mozku myši byl pozorován podobný efekt jako po podání antidepresiv [58].

V neprospěch této hypotézy však svědčí několik studií. Ve dvou z nich [67, 68] nebyly potvrzeny zvýšené hladiny ani jedné z možných sestřihových variant mRNA kódujících BDNF v hipokampu. Jedna studie [69] dokonce uvádí sníženou expresi genu pro BDNF v hipokampu při chronickém podávání fluoxetinu. Zvýšená exprese BDNF v jiných částech mozku jako je *nucleus accumbens* a *ventralní tegmentum* má pro-depresivní účinky, tedy účinek přesně opačný než jeho zvýšená exprese v hipokampu [70].



Obr.5 Neuroplastické změny neuronů. V levé části obrázku vidíme normální stav hipokampálního neuronu. Neuron je inervován dalšími neurony, které vyplavují monoaminy, glutamát a další látky. Je zde znázorněn i vliv BDNF uvolňovaného ze sousedních neuronů nebo z jiných částí mozku. V prostřední části obrázku vidíme neuron člověka s těžkou formou depresivního onemocnění. Stres způsobuje několik poškození jako je například snížení dendritické arborizace (větvení dendritů) a potlačuje expresi BDNF. Snížení transkripce je částečně způsobeno nadbytkem glukokortikoidů (kortizolu), které působí na CREB. V třetí části obrázku vidíme působení antidepresiv. Antidepresiva zlepšují dendritickou arborizaci a zvyšují expresi BDNF také působením na CREB. Převzato a upraveno podle [56].

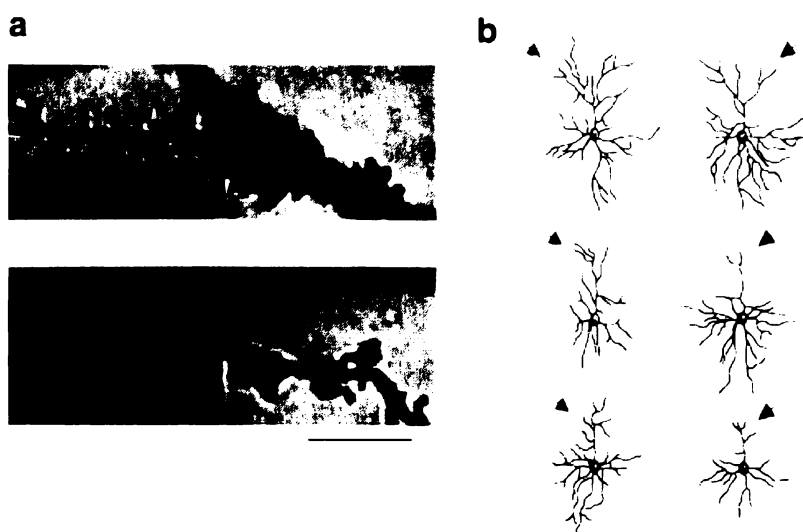
2.3.3.3 Hypotéza narušení hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy

Různé fyziologické i psychologické stresory vyvolávají vyplavování hormonu kortizolu do krevního oběhu z kůry nadledvinek, který se také často nazývá stresový hormon. Tento hormon souvisí s pocitem úzkosti a stresem, zvyšuje hladinu glukosy v krvi, zvyšuje krevní tlak, stimuluje katabolismus proteinů ve svalech a lipolýzu v tukových tkáních [71].

Koncentrace kortizolu v krevním řečišti je nepřímo řízeno kortikoliberinem (CRH) a arginin vasopresinem (AVP) syntetizovanými v hypothalamu. CRH a AVP účinkují synergicky v hypofýze, kde stimulují exocytosu a syntézu (pouze CRH) adrenokortikotropního hormonu (ACTH) do krevního oběhu. ACTH účinkuje v kůře nadledvin, kde stimuluje produkci a vylití glukokortikoidů do krevního řečiště. Kortizol negativní zpětnou vazbou reguluje množství syntetizovaného CRH a ACTH a také ovlivňuje hipokampus, který dále snižuje množství syntetizovaného CRH a ACTH [72].

Podle této hypotézy dochází k depresivnímu onemocnění z důvodu špatné regulace hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy. Během depresivního onemocnění byla zjištěna zvýšená hladina kortizolu v krvi [73], zvýšená hladina CRH v mozkomíšním moku [74] a zvýšený počet neuronů sekretujících CRH v mozku [75]. U pacientů trpících depresivním onemocněním způsobilo intravenózní podání CRH menší uvolnění ACTH než u zdravých jedinců. Tento fakt lze vysvětlit sníženou citlivostí (zmenšením počtu) receptoru pro CRH na hypofýze [75]. Nízké koncentrace kortizolu (tj. u zdravých pacientů) zvyšují aktivitu hipokampu, tedy také zvyšují zpětnovazebnou funkci hipokampu na hypothalamus. Při vyšších koncentracích ovšem dochází k poškození neuronů v hipokampu a tedy ke snížení zpětné vazby [76]. Přesný mechanismus tohoto poškození není dosud znám [76]. Ví se ale, že dochází k poškození neuroplasticity v hipokampu (pravděpodobně účinek kortizolu na CREB, čímž se snižuje intenzita přepisu BDNF [56]) a podle novějších studií i v jiných částech mozku (například v prefrontální kůře předního laloku) [77]. Při tomto poškození dochází k odumírání apikálních dendritů u pyramidálních buněk hipokampu (obr. 6 str. 25) [76]. Snížení zpětné vazby vede k přílišnému uvolňování CRH, což má za následek nadměrnou syntézu kortizolu.

Nadměrná syntéza kortizolu a špatná zpětná vazba by mohly vést k depresivnímu onemocnění, při jehož úspěšné léčbě dochází ke snížení koncentrace kortizolu až na hladinu srovnatelnou s hladinou zdravých jedinců [56].



Obr.6 Změna neuroplasticity neuronů. a) změna počtu dendritů v prefrontální kůře u stresovaného (dole) a nestresovaného (nahore) mláděte myši b) dlouhodobě stresované myši (červená šipka) měly podstatně kratší a méně komplexní apikální dendrity než myši nestresované (zelená šipka). Převzato a upraveno podle [78]

Je ovšem nutno zmínit, že nadměrná aktivita hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy byla pozorována pouze u 50 % případů pacientů [56]. Stejně tak není zřejmé, zdali nadměrná aktivita hypothalamo-hypofýzo-nadledvinové osy je příčinou depresivního onemocnění nebo je to pouze důsledek jiných změn [56].

2.3.3.4 Epigenetická hypotéza

Epigenetické změny jsou takové změny, které mění aktivitu genu, aniž by měnily vlastní sekvenci DNA [79]. Jak u zvířat, tak u lidí byly zjištěny různé hladiny mRNA mezi zdravými jedinci a jedinci trpícími depresivním onemocněním ve specifických částech mozku a tato změna je spojována se změnou chování. Dlouho nebyl znám molekulární mechanismus vzniku tohoto rozdílu hladin, protože většina transkripčních faktorů a dalších regulačních proteinů účinkuje nejdéle několik dní a ne týdnů či dokonce měsíců, jak je pozorováno při depresivních onemocněních. Na druhou stranu kovalentní změny DNA (např. methylace), posttranslační modifikace N-konců u histonů (např. acetylace, methylace) mohou přetrvávat mnohem déle. Epigenetika nabízí možnost vysvětlení, jak by mohly okolní vlivy změnit intenzitu přepisování genů beze změn v

sekvenci DNA, což by mohlo vést k depresivnímu onemocnění (například snížením přepisu genu pro BDNF) [80].

Epigenetické změny byly pozorovány při mnoha psychických onemocněních [80], vědci se při zkoumání deprese zaměřili především na tři epigenetické změny (obr 7 str. 27).

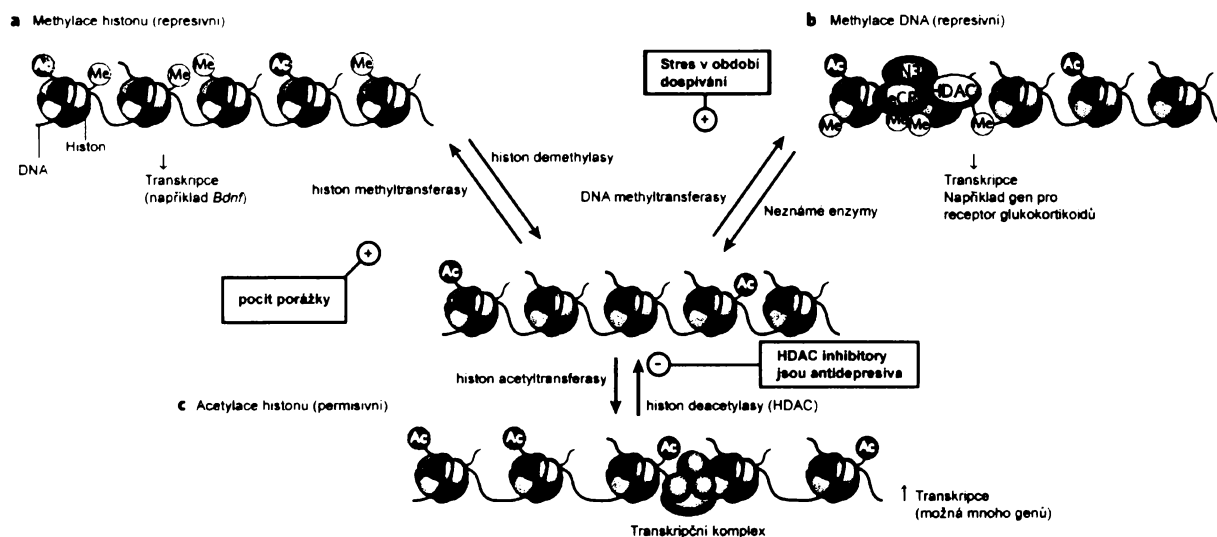
První možnou změnou je methylace cytosinu u dinukleotidové sekvence CpG. Tato methylace je katalyzována methyltransferásou a donorem methylu je S-adenosyl methionin. Obecně CpG dinukleotidová sekvence je do značné míry methylovaná, ale v oblasti promotorové je methylovaná méně. Čím více je promotor methylován, tím méně bude gen přepisován [80]. Po methylaci může také dojít k zesílení represe navázáním represorů na methylovaná místa DNA jako je methyl-CpG vázající protein (MeCP2) či SIN3A. MeCP2 se váže na DNA navázanou i nenavázanou na histonech. SIN3A interaguje s histondeacetylásou (viz. dále), která zvyšuje represi [81].

Tato methylace byla například pozorována u potkaních mláďat, kterým matka neprojevovala dostatečnou pozornost. Protože byl nadměrně methylován promotor u genu kódujícího receptor pro glukokortikoidy, byla exprese tohoto receptoru v hipokampu podstatně menší než u těch, o která se matka starala lépe. U mláďat bylo možno během dorůstání pozorovat některé symptomy depresivního onemocnění [82]. Důležité je podotknout, že při nedostatečné péči o mláďata byl ovlivněn přepis stovky genů, ne pouze genu kódujícího receptor pro glukokortikoid (ten zde byl vybrán pouze jako příklad) [83].

Druhou možnou změnou je dobře popsáný mechanismus acetylce a deacetylce histonů. Acetylce histonů má za následek dekondenzaci heterochromatinu na euchromatin, což umožňuje přepisování genu. Bylo odhaleno několik acetyltransferas acetylujících histony (HAT) a byla nalezena acetyltransferasová aktivita u několika transkripčních aktivátorů [84]. Deacetylce histonů probíhá pomocí enzymů histondeacetylasy (HDAC) a tato aktivita byla zjištěna u několika represorů [84]. Inhibicí tohoto enzymu (butanoátem sodným) bylo dosaženo antidepresivních účinků [85].

Třetí možnou změnou je methylace histonu, která podle místa methylace buď aktivuje, nebo potlačuje přepis. Například methylací lysinu 4 histonu H-3 dojde k aktivaci a methylací lysinu 9 histonu H-3 dojde k represi. U myší vystavených dlouhodobému stresu ze sociálního neúspěchu (chronic social defeat stress) byla nalezena

snížená hladina mRNA pro BDNF v důsledku methylace histonu v oblasti promotoru pro tento gen [85].



Obr.7: Epigenetická regulace přepisu genů

a) Methylace lysinového zbytku histonu způsobí kondenzaci chromatinu. Tímto způsobem dochází k represi přepisu genů, b) jiný způsob represe je methylace DNA na cytosinu u dinukleotidové sekvence CpG, která je katalyzována enzymem methyl-transferázou. Zpětná demethylace je možná, ale enzym zatím nebyl nalezen (lépe řečeno - vedou se spory o možné enzymy [82]). Tato represe může být ještě umocněna represory jako je SIN3A, protein vázající methyl-CpG (MeCP2), či histon deacetylase (HDAC), c) acetylce histonů způsobí rozvolnění heterochromatinu a zvýšený přepis daného genu. Inhibice HDAC vykazuje antidepresivní účinky (Ac=acetyl; Me= methyl). Převzato a upraveno podle [86]

2.4 Léčba depresivních onemocnění

V této kapitole jsou popsány současné prostředky dostupné k léčbě depresivních onemocnění. Většina pozornosti je zaměřena na léčbu unipolární deprese a dystymie.

Unipolární deprese je léčena pouze u poloviny lidí, kteří touto psychickou poruchou trpí [87]. V současné době se léčí unipolární deprese především třemi metodami: psychoterapií, pomocí antidepresiv a elektrokonvulsivní terapií. Existuje mnoho dalších minoritních metod jako je fototerapie, léčba pomocí akupunktury, bylinná léčba a řada dalších. Tyto metody jsou mimo rozsah této práce.

Zatímco dříve byla unipolární deprese často léčena specialisty v oboru pomocí psychoterapie, dnes se dává přednost léčbě pomocí antidepresiv [88]. Většina antidepresiv je předepisována praktickými lékaři, ne specialisty, což může vést ke špatnému dávkování a špatné léčbě jako takové. Kvalita léčby se za posledních 20 let podstatně zhoršila [6]. Zhoršená kvalita léčby je kompenzována modernějšími antidepresivy, která mají menší vedlejší účinky a jsou účinnější [89]. Často se také využívá léčby kombinované, což znamená, že jsou pacientovi podávána antidepresiva a zároveň podstupuje psychoterapii [90]. Tato léčba je však drahá, a proto málo využívaná.

Při léčbě unipolární deprese se snaží jedinec dosáhnout stavu remise. Tento stav je definován třemi kritérii, které pacient musí splnit:

- Při HAM-D testování nesmí dosáhnout více než sedmi bodů
- Nemá již dále symptomy unipolární deprese
- Nesplňuje už kritéria unipolární deprese podle manuálu diagnostické klasifikace poruch a nemocí (DSM-IV).

V praxi se často od tohoto trojího testování ustupuje, jelikož je časově velice náročné. Častěji expert vhodnými otázkami zjistí, jestli pacient dosáhl stavu remise či nikoliv. Lidé často ale remise nedosáhnou (asi v 50 % případů), stále vykazují symptomy onemocnění a je vysoké riziko, že znovu onemocní. [89].

2.4.1 Léčba psychoterapií

Psychoterapie je založena na rozmluvě pacienta se specialistou, nejčastěji psychologem či psychiatrem. Specialista se snaží odhalit, co pacienta tíží a pomoci mu nalézt řešení z těžkých situací. Zároveň se snaží pacienta naučit myslet pozitivně, mít rád sám sebe a naučit ho řešit problémy. Psychoterapie je buď individuální, pacient je sám se specialistou, nebo skupinová, kde je větší množství pacientů. Od psychoterapie se posledních 20 let ustupuje, protože je mnohem časově i finančně náročnější, ale je stále preferována u pacientů mladších 18 let [91].

2.4.2 Léčba pomocí elektrokonvulsivní terapie

Při elektrokonvulsivní terapii je pacient uveden do umělého spánku a poté vystavován elektrickým šokům v oblasti hlavy. Tato metoda se používá při léčbě závažných unipolárních i bipolárních depresí, obvykle když pacient již není schopen jíst nebo se pokusil spáchat sebevraždu. Elektrokonvulsivní terapie je také léčbou poslední volby. Pacient, kterému nezabrala léčba pomocí antidepresiv ani psychoterapie, podstupuje často tuto terapii [92]. Vlastní účinek elektrokonvulsivní terapie je pravděpodobně zvyšování koncentrace BDNF a CREB v mozku [58]. Největší nevýhodou této metody jsou její vedlejší účinky. Často totiž vyvolá ztrátu paměti [93]. Tento vedlejší účinek lze zeslabit pomocí různých typů elektrokonvulsivní terapie jako je bilaterální elektrokonvulsivní terapie (jiné rozmístění elektrod na hlavě) [92].

2.4.3 Léčba pomocí antidepresiv

Léčba unipolární deprese pomocí antidepresiv je v posledních letech nejvíce využívanou metodou [88]. Antidepresiva jsou určena především k léčbě těžké, ale i lehké unipolární či bipolární deprese. Antidepresiva jsou účinná v 60-70 % případů [94]. Účinek se většinou dostaví až po několika týdnech užívání. Od konce 50. let minulého století, kdy byla vyvinuta první antidepresiva, došlo k radikálním změnám a velkému rozmachu těchto léčiv. Antidepresiva jsou bezpečnější, mají méně vedlejších účinků, jejich objevení již nezávisí na náhodě, ale jsou navrhována tak, aby působila na specifických místech v organismu (například specifická inhibice přenašečů pro zpětnovazebné „vychytávání“ neurotransmiterů) [95].

O rozmachu antidepresiv svědčí i výroční zpráva z roku 2007, ve které se uvádí, že léky proti depresivním onemocněním byly pátým nejprodávanějším typem léků ve Spojených státech amerických a Zoloft® (účinná látka sertralin) byl pátý nejprodávanější lék v USA [96].

Antidepressiva dělíme podle účinku na organismus do několika skupin:

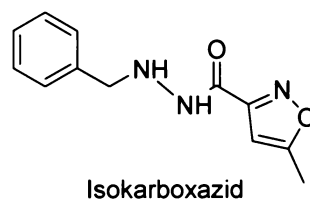
- Inhibitory enzymu monoaminoxidasy (MAOI).
- Tricyklická antidepressiva (TCA).
- Selektivní inhibitory zpětného „vychytávání“ serotoninu (SSRI).
- Další antidepressiva (atypická antidepressiva).

Prvním dvěma skupinám se někdy také říká antidepressiva první generace a druhým dvěma skupinám antidepressiva druhé generace. Někteří autoři uvádějí i skupinu třetí generace, do které zařazují nejnovější antidepressiva [97].

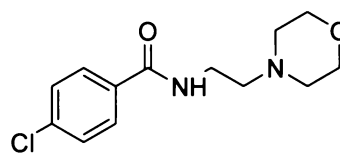
2.4.3.1 Inhibitory monoaminoxidasy (MAOI)

Antidepressiva se používají již od konce 50. let minulého století, kdy byla objevena zcela náhodou při pokusu o přípravu léku proti tuberkulóze jménem Iproniazid[®]. Brzy poté podařilo zjistit molekulární účinek tohoto léku - inhibice monoaminoxidasy. Enzym monoaminoxidasa (MAO) se vyskytuje ve dvou izoformách – MAO A a MAO B. Tyto dvě izoformy jsou hlavními enzymy odbourávajícími neurotransmitery serotonin, noradrenalin a dopamin v cytoplazmě. MAO A degraduje především serotonin, MAO B degraduje především 2-fenyl ethylamin. Dopamin a noradrenalin jsou odbourávány oběma izoformami tohoto enzymu, nacházejí se v cytoplazmě buněk s nejvyšší koncentrací v blízkosti mitochondrií [98].

MAOI inhibují obě izoformy tohoto enzymu (většina psychofarmak). Tato inhibice vede ke snížení degradace neurotransmiteru a zesílení přenosu signálu. MAOI se dělí do dvou skupin: hydrazinové MAOI a nehydrazinové MAOI, podle přítomnosti hydrazinové skupiny. Princip inhibice je u hydrazinových MAOI založen na kovalentním navázání tohoto inhibitoru na enzym. Tato vazba je ovšem silně nespecifická a vede v mnoha



Isokarboxazid



Moclobemid

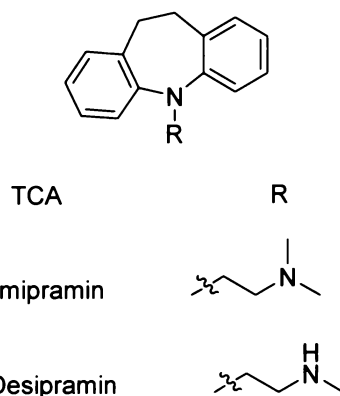
Obr.8 Příklady MAOI

případech k silným vedlejším účinkům (časté navázání i na jiné enzymy). Účinek těchto antidepresiv je díky kovalentní vazbě dlouhodobý. Hydrazinové MAOI, mezi něž patří například fenelzin a isokarboxazid, se již prakticky nevyskytují na trhu, především kvůli svým vedlejším účinkům. Antidepresiva ze skupiny nehydrazinových MAOI se vážou na enzym kompetitivně, ale také zcela nespecificky. I u tohoto typu jsou časté vedlejší účinky, ale díky jeho mechanismu (kompetitivní inhibice) nepřetrvávají tak dlouho. Typickým zástupcem této skupiny je moclobemid (obr. 8 str. 29) [97].

Největší nevýhodou MAOI jsou vedlejší účinky způsobené nízkou specifitou inhibice. K nejčastějším patří křeče, třes, problémy se zrakem, impotence a řada dalších problémů [98].

2.4.3.2 Tricyklická antidepresiva (TCA)

Tricyklická antidepresiva se objevila hned po uvedení MAOI. Jak již název napovídá, TCA jsou chemická individua, která obsahují tři cykly (obr. 9). K léčení unipolární deprese byla používána po čtyři desetiletí, nyní se od nich ustupuje - především kvůli značným vedlejším účinkům. Používají se spíše v rozvojových zemích, protože jsou levná. TCA inhibují zpětné „vychytávání“ monoaminu ze synaptické štěrbině a tím zesilují přenesený signál. Inhibice je ovšem zcela nespecifická a vede k řadě vedlejších účinků.



Obr.9 Typická TCA

Tato skupina se dále dělí na dvě podskupiny: tricyklická antidepresiva s terciárními aminy [amitriptylin, imipramin (obr. 9)] a tricyklická antidepresiva se sekundárními aminy [desipramin (obr. 9)]. Terciární aminy jsou v těle velice rychle degradovány na aminy sekundární, které jsou vlastní účinnou látkou. Velkou nevýhodou TCA je možnost snadného předávkování se těmito psychofarmaky a řada vedlejších účinků způsobených nespecifickou inhibicí přenašečů. Mezi typické vedlejší účinky patří například potíže se zrakem a vylučovací soustavou či sexuální obtíže [97].

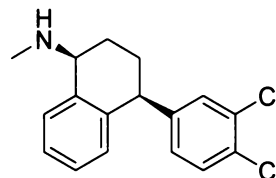
2.4.3.3 Selektivní inhibitory zpětného „vychytávání“ serotoninu (SSRI)

SSRI jsou též nazývaná jako antidepresiva druhé generace, protože mají podobný efekt jako skupina TCA - inhibují zpětné „vychytávání“ serotoninu presynaptickými buňkami - ale mají minimální vedlejší účinky. Oproti TCA jsou tato antidepresiva velice specifická k serotoninovému přenašeči. Některé SSRI částečně inhibují i noradrenalinový přenašeč (paroxetin), ale tato inhibice je minoritní. Většina SSRI nemá prakticky žádnou afinitu k dalším přenašečům (dopaminové atd.).

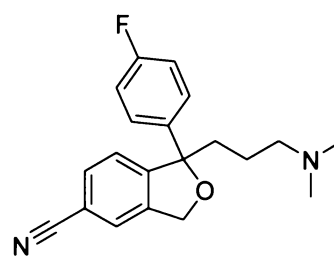
SSRI pravděpodobně účinkují v mozku i jinak než blokací přenašečů serotoninu (tato domněnka je založena na dlouhé prodlevě mezi podáním a účinky léčiv), tento mechanismus ale zatím není znám [94].

SSRI patří v poslední době k nejčastěji užívaným antidepresivům. Výhodou SSRI také je, že předávkování pomocí těchto léků nebývá smrtelné [97]. Do této skupiny patří například paroxetin, femoxetin, sertralin, fluoxetin a citalopram (obr. 10). (V ČR často používaný pod komerčním názvem Cytalec®).

Právě specifická inhibice serotoninového přenašeče zajišťuje snížení počtu vedlejších účinků. K těm patří především pocit nevolnosti a ztráta libida. Dalším vedlejším účinkem, specifickým především pro tuto skupinu, je takzvaný serotoninový syndrom. Ten je způsoben příliš silným přenosem signálu neurotransmitterem serotoninem, což se projeví především třesem, ojediněle i kardiovaskulárními potížemi [98].



Sertralin



Citalopram

Obr. 10 Typická antidepresiva typu SSRI

2.4.3.4 Další antidepresiva

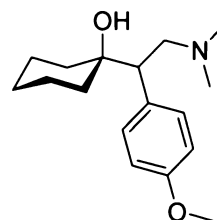
Do této skupiny patří antidepresiva, která mají odlišný způsob účinku od prvních tří skupin. Patří sem například venlafaxin (obr. 11), trazadon, nefazodon, bupropion a tianeptin. Mechanismus těchto léků je různý, například bupropion také zabraňuje zpětnému „vychytávání“ neurotransmiteru ze synaptické štěrbině, konkrétně dopaminu a noradrenalinu. Jiné účinkují zcela odlišným způsobem, například fungují jako antagonisté na serotoninových receptorech v synaptické štěrbině (trazodon). Mechanismus některých dalších antidepresiv zatím nebyl odhalen [99].

Někteří autoři z této skupiny vyčleňují antidepresiva, která specificky blokují zpětné „vychytávání“ noradrenalinu (SNRI; reboxetin, temoxetin) a antidepresiva, která specificky inhibují zpětné „vychytávání“ noradrenalinu a serotoninu (NaSRI; mirtazapin) [100].

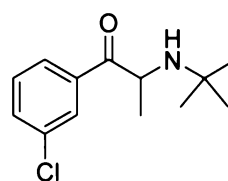
Vedlejší účinky těchto antidepresiv jsou většinou málo časté a nebývají závažné. Pacienti často uvádějí pocit suchosti v ústech, závratě, vzácně mohou způsobit srdeční arytmii [98].

2.4.3.5 Porovnání komerčně dostupných antidepresiv

Mezi SSRI léčivy a léčivy první generace (TCA a MAOI) nebyl nalezen žádný rozdíl v jejich účinnosti, pouze v množství vedlejších účinků a tedy počtu pacientů, kteří léčbu přerušili [94]. Bylo provedeno velké množství studií porovnávajících různé SSRI mezi sebou (sertralin vs. fluoxetine, paroxetine vs. fluoxetin atd.). Jediným rozdílem je poločas degradace v organismu, který se pro většinu antidepresiv pohybuje v rozmezí 20-30 hodin (sertralin), ale pro fluoxetin je to 4-16 dní. Nebyl ovšem nalezen prakticky žádný nebo zcela minimální rozdíl v účinnosti, ovlivnění kvality života či vedlejších účinků. Mezi



Venlafaxin



Bupropion

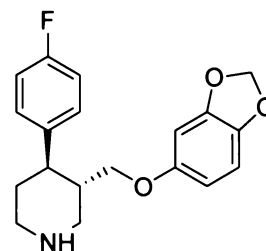
Obr.11 Atypická antidepresiva

léky SSRI a léky ze skupiny dalších antidepresiv také nebyl pozorován větší rozdíl v účinnosti. Pouze pro venflaxin se účinek dostavuje u více pacientů než u SSRI, ale na druhou stranu má zase častější vedlejší účinky. Další drobný rozdíl byl nalezen v rychlosti odpovědi na psychofarmaka; průměrná doba odpovědi u všech léčiv druhé generace byla 4-6 týdnů, mirtazapin měl interval o něco kratší. Největším úskalím těchto studií je ovšem fakt, že jejich většina je sponzorována farmaceutickými společnostmi, je tedy otázkou, do jaké míry jsou tyto informace nestranné [101].

2.4.3.6 Paroxetin

Paroxetin (obr. 12) je psychofarmakum typu SSRI a patří k nejčastěji používaným antidepresivům vůbec. Používá se k léčení depresivních onemocnění, panického strachu, obsesivních kompulzivních poruch a chronických bolestí hlavy.

Jedná se o inhibitor zcela nejsilněji blokující serotoninový přenašeč ze všech komerčně dostupných psychofarmak. Zároveň se ale také jedná o nejsilněji inhibující přenašeč noradrenalinu ze skupiny látek typu SSRI. Je zároveň slabým inhibitorem NO syntasy. Vlastní antidepresivní účinek je způsoben blokací zpětného „vychytávání“ serotoninu, což vede k zesílení přenosu signálu mezi neurony.



Paroxetin je dobře absorbován a trvá 4-11 dní, než se **Obr. 12 (+)-Paroxetin** ustanoví stálá koncentrace v plazmě pacienta. Poločas biologické degradace paroxetinu je zhruba 21 h [102].

Mezi nejčastější vedlejší účinky paroxetinu patří pocit na zvracení, poruchy spánku a časté průjmy.

2.5 Přírodní látky jako léčiva

Přírodní látky sloužily jako léčiva již zhruba před 5000 lety především ve formě rostlinných extraktů. Těch bylo používáno hojně během lidských dějin a jsou do určité míry používány dodnes. V 19. a 20. století se začaly objevovat chemické struktury účinných látek z biologického materiálu, což přirozeně přivedlo na myšlenku připravovat

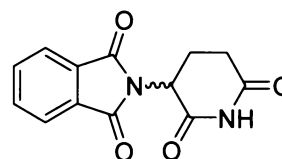
chemická individua také synteticky namísto extrakce z rostlin (nebo z živočichů). Od těchto dob mezi sebou soutěží dva přístupy přípravy léčiv: extrakce z přírodního materiálu (rostlin či živočichů) a totální syntéza, která může být navíc použita k dalším derivatizacím molekul s cílem zvýšení účinku léčiv. Jako všude i zde rozhoduje cena, levnější cesta je preferována [103].

2.6 Totální syntéza přírodních látek

Totální syntéza je chemická syntéza, často několikastupňová (více reakcí za sebou), složitějších molekul z látek jednoduchých, většinou komerčně dostupných. Totální syntéza se používá především k syntéze látek biologicky aktivních nebo látek jinak významných, které je obtížné získat z biologického materiálu [104].

První chemická syntéza byla provedena roku 1828, kdy Wöhler syntetizoval močovinu z kyanidu amonného. Úspěšný pokus byl následován Kolbem, kterému se v roce 1845 podařilo syntetizovat kyselinu octovou. Tento muž také poprvé použil slovo syntéza ve spojení s přeměnou výchozích látek na produkty. Další průlom zaznamenal E. Fischer svojí syntézou glukosy. Byla první syntézou, ve které se vyskytovala chirální centra. Postupem času s vyvíjející se technikou a metodami byl člověk schopen syntetizovat složitější látky. Jako příklad lze uvést několik látek připravených v druhé polovině 20. století: kortizol (1951), strychnin (1954), vitamín B12(1973) [105] či (+)-Biotin (1988) [104].

Největší výzvou a zároveň největší překážkou pro chemiky při syntéze přírodních látek nebo léčiv byla a jsou stereogenní centra. Léčiva je často nutno připravit chirálně čistá. Jako důkaz bohužel slouží známá aféra molekuly thalidomidu (obr. 13). První možností přípravy chirálních látek je použití asymetrické syntézy. Druhou možností je připravit látku racemickou, poté směs rozdělit na čisté enantiomery. Rozdělovat racemickou směs je ovšem náročné a tato cesta vyžaduje dvojnásobné množství výchozích látek.



Obr.13 Thalidomid

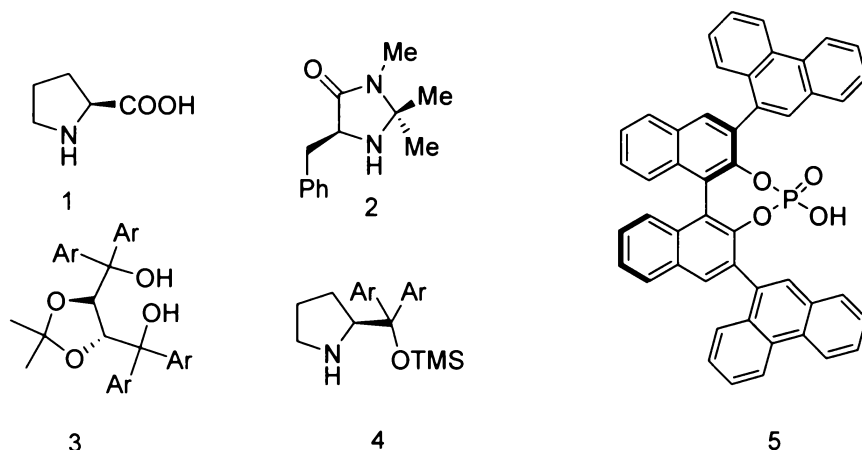
Do roku 2000 převládalo v asymetrické syntéze především používání kovů jako katalyzátorů a zdálo se, že tomu tak zůstane. V roce 2000 však byly publikovány dvě práce, ve kterých byla popsána asymetrická syntéza pomocí jednoduchých organických

molekul – prolinu [106] a derivátu imidazolidinu [107]. Daly tak vznik novému oboru zvaného organokatalýza. Počet prací, které se zabývají tímto novým typem chemie, narůstá od roku 2000 exponenciální rychlostí. Jak lze vidět, organokatalýza se během posledních let zařadila mezi často používané syntetické metody [108].

2.6.1 Asymetrická organokatalýza

Asymetrická organokatalýza je obor, který se zabývá asymetrickými chemickými transformacemi katalyzovanými malými organickými molekulami (obr. 14), obsahujícími atomy C, H, N, O, P, S. Tyto katalyzátory se většinou používají v substechiometrických množstvích (5-40 molárních %). Mechanismus katalýzy je založen na principu stabilizace meziprojektu vodíkovým můstkem (schéma 1 str. 38), nebo na stérickém bránění reakčního centra katalyzátorem, což vede ke vzniku přednostně jednoho enantiomerního produktu (schéma 2 str. 39).

Jak již bylo řečeno, organokatalýza je rychle se rozvíjejícím oborem. Přináší řadu výhod oproti katalýze kovů: a) reakce katalyzované organickými molekulami mohou být prováděny za aerobních podmínek a ve vodných rozpouštědlech, b) jsou méně toxické a tedy šetrné k životnímu prostředí (proto se také organokatalýza nazývá „zelená chemie“). Toxicita je velice důležitým faktorem především při výrobě léčiv (odstraňování zbytků kovů je velmi nákladné) [109].



Obr. 14 Příklady nejčastěji používaných katalyzátorů v asymetrické organokatalýze 1) prolin, 2) derivát imidazolidinu, 3) chirální diol, 4) derivát prolinou, 5) polyaromaticky substituovaná kyselina fosforečná

Organická katalýza se rozděluje do několika podskupin podle schématu uvedeného na další straně:



Nejčastěji používaným typem organokatalýzy je katalýza Lewisovými basemi, a proto budou následující kapitoly věnovány právě této oblasti.

2.6.1.1 Enaminová aktivace

Enaminová aktivace je aktivace molekuly karbonylu pomocí sekundárního aminu. Poprvé se tento typ reakce objevil v roce 1974, kdy Hajos a Parrish [110] uvedli syntézu chirální bicyklické sloučeniny pomocí enaminové aktivace prolinem. V této práci ovšem nebyl prolin použit jako katalyzátor, ale byl použit ve stechiometrickém množství. Užití enaminové aktivace molekulou prolinu v substechiometrickém množství uvedli jako první List, Lerner a Barbas ve své práci o asymetrické aldolové kondenzaci (schéma 1 str. 38) [106].

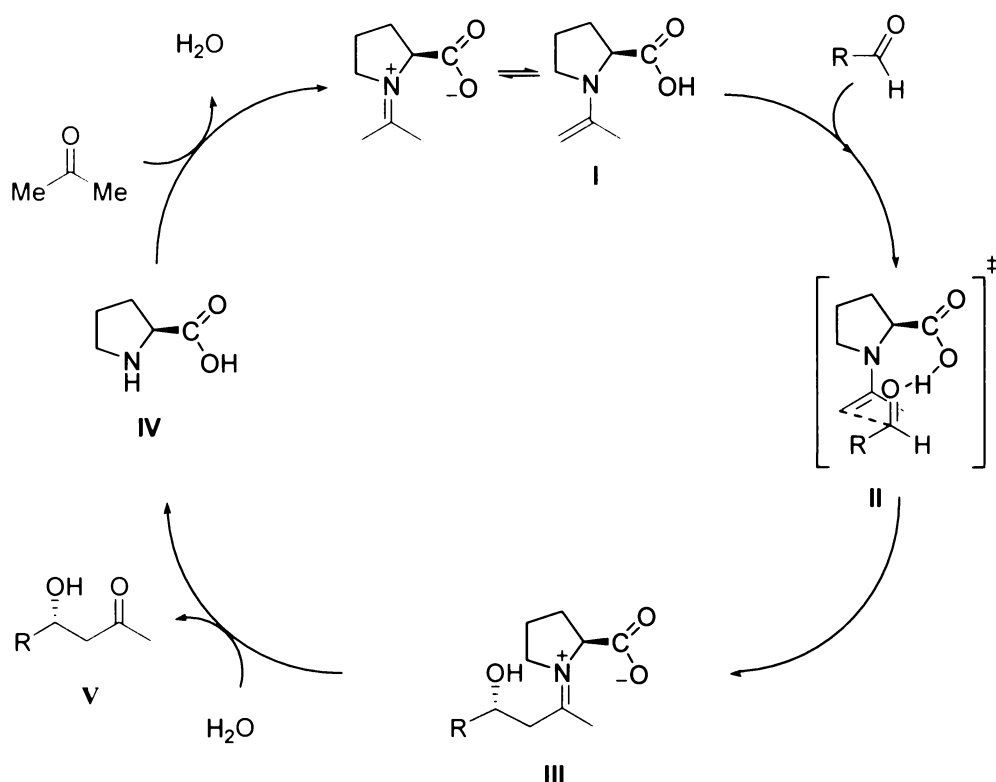


Schéma 1: Předpokládaný mechanismus asymetrické aldolové kondenzace katalyzované prolinem [106].

Enaminový intermediát (I), vzniklý reakcí výchozího ketonu s prolinem (katalyzátorem), pomocí vodíkové interakce (II) řídí enantioselektivní atak na přístupující elektrofil za tvorby iminiového intermediátu (III), který se hydrolyticky štěpí za uvolnění katalyzátoru (IV) zpět do reakčního cyklu a produktu aldolové kondenzace (V).

Druhým možným mechanismem je sterické bránění katalyzátorem výchozí látky přístupu z jedné strany, díky tomu vzniká přednostně jeden z enantiomerních produktů. Jako příklad lze uvést katalyzátor navržený Jorgensenem (schéma 2 str. 39) [111].

Využití asymetrické syntézy pomocí sekundárních aminů se stalo základem moderní organické chemie. Pomocí tohoto typu katalýzy lze připravit řadu nových vazeb v α poloze u aldehydů a ketonů, jako jsou vazby C-C, C-N, C-X (X=halogen), C-S, C-O. Díky velkým možnostem, které tento typ katalýzy poskytuje, bylo vytvořeno značné množství nových katalyzátorů. To vede často k zdlouhavé práci hledání nejlepšího katalyzátoru pro navrženou reakci, protože pouze několik katalyzátorů je univerzálních [111].

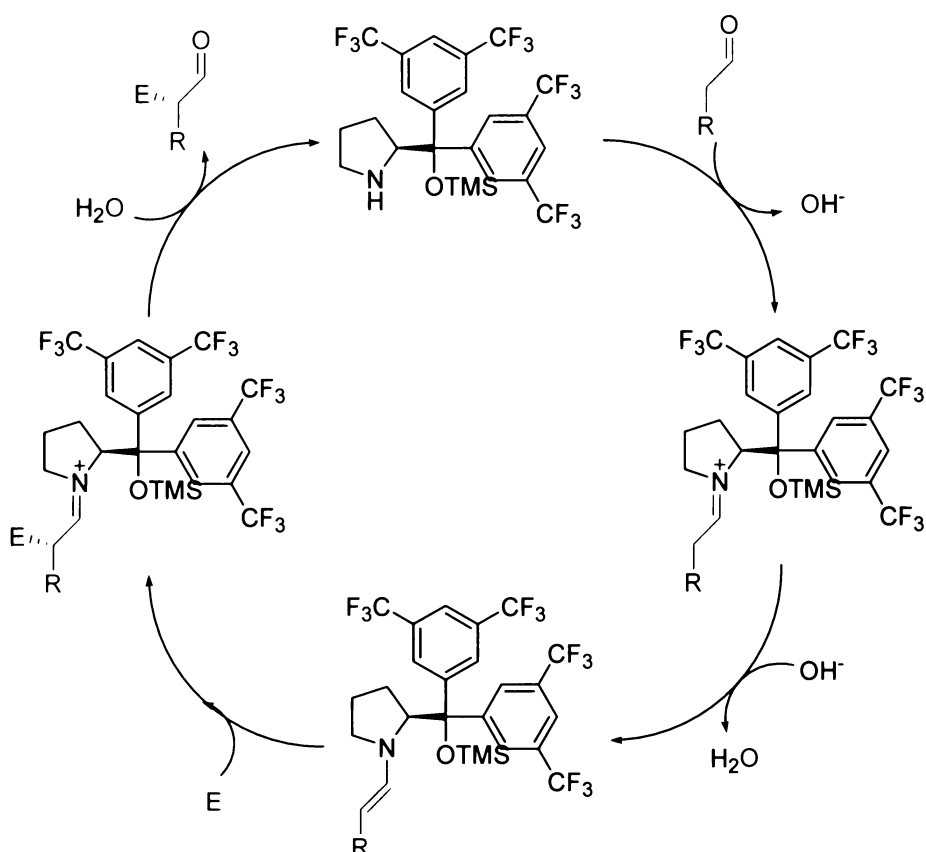


Schéma 2: Katalýza pomocí Jorgensenova katalyzátoru. Jak je vidět ze schématu, katalyzátor zabraňuje elektrofilu přistoupit z jedné strany, a proto vzniká přednostně jeden z enantiomerních produktů. E =elektrofil

2.6.1.2 Iminiová aktivace

MacMillan v roce 2000 publikoval asymetrickou Diels-Alderovu syntézu, katalyzovanou derivátem imidazolidinu s vynikajícím výtěžkem i enantioselektivitou [107]. Mechanismus iminiové katalýzy je na stejném principu jako katalýza enamínová, tedy vznik přednostně jednoho produktu z možných dvou je způsoben buď stabilizací intermediátu, nebo pomocí stérického bránění. V iminiové katalýze reagují ovšem jiné výchozí látky - α,β -nenasycené karbonyly s nukleofilem. Reakcí chirálního aminu s α,β -nenasyceným karbonylem tvoří iminiový ion. Energetická hladina nejnižší neobsazeného molekulového orbitalu (LUMO) je snížena tak, že iminiový ion může reagovat perycyklickou reakcí či konjugační adicí s vhodným nukleofilem (schéma 3 str. 40). Tato katalýza navíc nabízí možnost tandemových reakcí [111].

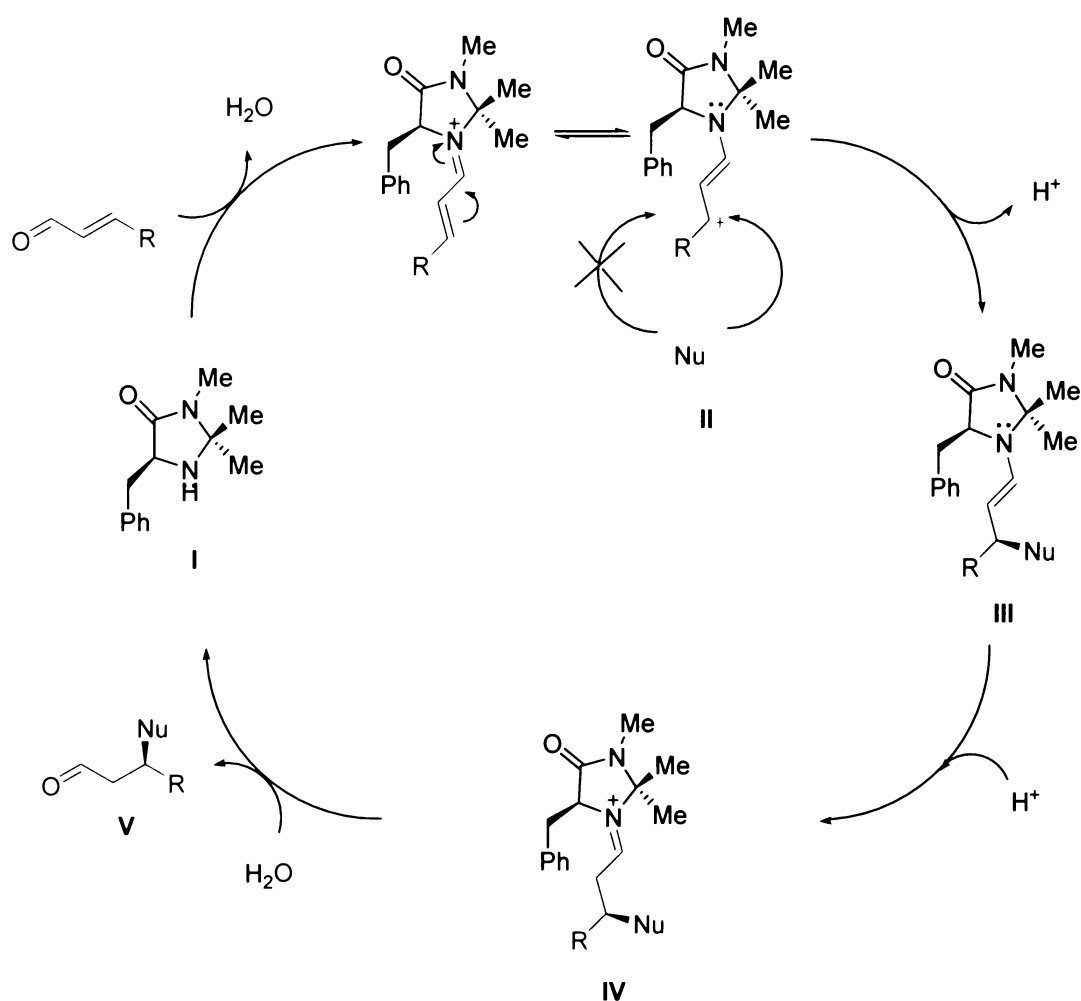


Schéma 3: Iminiová aktivace. Iminiová katalýza chirálním sekundárním aminem (derivátem imidazolidinu). Nu=nukleofil,

Jak lze vidět z mechanismu iminiové katalýzy (schéma 3), benzylová skupina zabraňuje nukleofilnímu útoku z jedné strany (II), což má za následek vznik přednostně jednoho enantiomeru (III). Výsledný produkt může dále intramolekulárně reagovat (takzvané tandemové reakce).

2.6.1.3 SOMO aktivace

V roce 2008 MacMillanova skupina uvedla zcela nový typ organické katalýzy, takzvanou SOMO-aktivaci (single occupied molecular orbital) [112]. Při této katalýze opět

hraje důležitou roli stérické bránění katalyzátorem, ale co činí tuto metodu unikátní, je vytvoření radikálů v reakční směsi pomocí dusičnanu amono-cerického (schéma 4). Jedná se o zcela nový typ katalýzy a zdaleka tedy nejsou prozkoumané její možnosti [112].

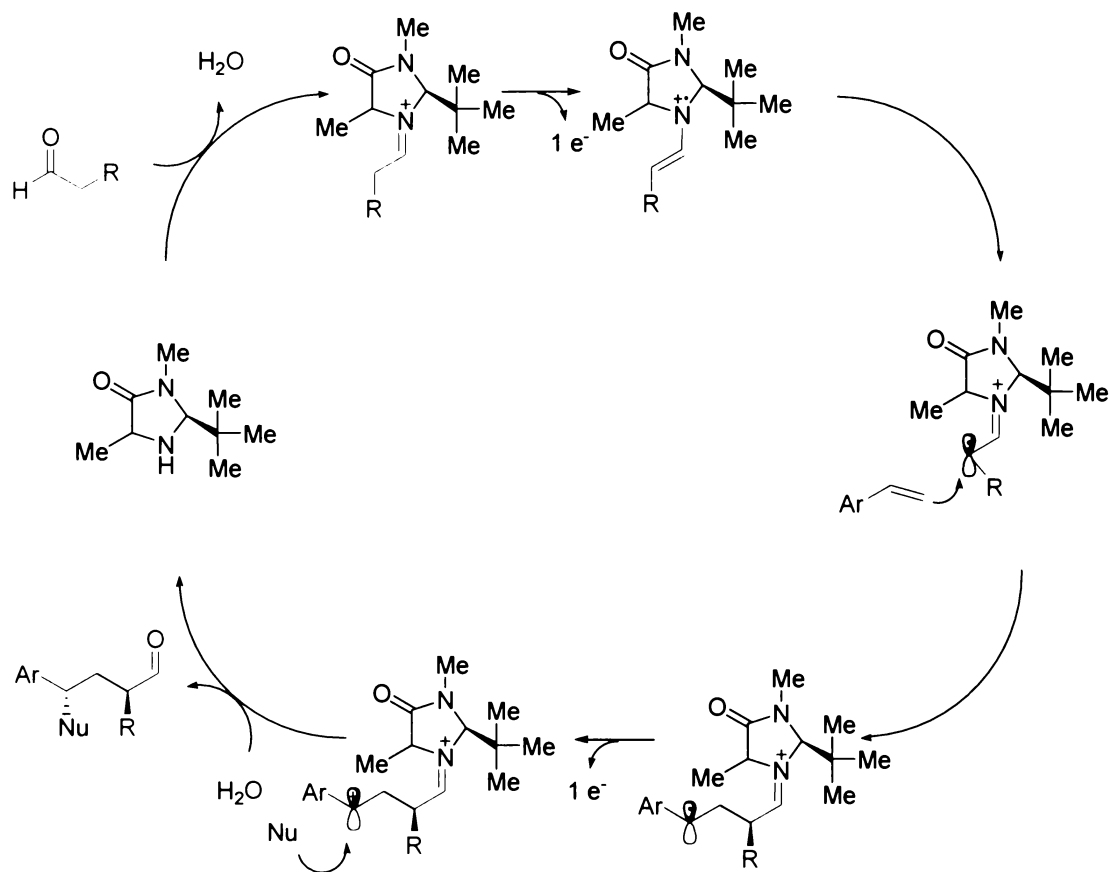


Schéma 4: SOMO katalýza. Odebrání elektronu je zprostředkováno dusičnanem amono-cerickým. E=elektrofil, Nu= nukleofil

3. Cíle práce

Obecným cílem této bakalářské práce bylo prozkoumání problematiky týkající se depresivních onemocnění s následným prozkoumáním možnosti aplikace organokatalytických reakcí na přípravu jednoho z vybraných komerčně dostupných antidepresiv. Tento obecný cíl zahrnoval několik dílčích úkolů:

1. Prozkoumání problematiky týkající se depresivních onemocnění se zaměřením na podstatu onemocnění a léčbu pomocí psychofarmak.
2. Nalezení vhodného komerčně dostupného antidepresiva, na jehož přípravu lze aplikovat organokatalytický koncept.
3. Navržení formální syntézy antidepresiva (paroxetinu) a její následné ověření.

4. Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

Název chemikálie	Firma
Hexan sudový	Lachema, Neratovice, ČR
Ethyl-acetát sudový	Lachema, Neratovice, ČR
Dichlormethan sudový	Lachema, Neratovice, ČR
Toluen sudový	Lachema, Neratovice, ČR
Heptane CHROMASOLV Plus for HPLC	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
2-propanol, CHROMASOLV Plus for HPLC	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
Methanol HPLC (99,9%)	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
Tetrahydrofuran (>99,9 %)	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
E-3-fenyl prop-2-enal	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
Ethyl 3-chloro-3-oxopropionát	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
Triethylamin (99,5%)	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
Benzaldehyd	Ferak, Berlín, Německo
4-fluor benzaldehyd	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
E-3-naftyl prop-2-enal	připravil RNDr. Jan Veselý PhD
4-nitro benzaldehyd	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
Octan draselný	Penta, Chrudim, ČR
Deuterovaný chloroform (99,8 %)	Chemotrade, Leipzig, Německo
Benzyl amin	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
(trifenyfosforanyliden)acet aldehyd	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
(S)-(-)- α,α -difenyl-2-pyrolidinmethanol trimethylsilyl ether (95 %)	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
(S)-(-)- α,α -difenyl prolinol	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
L-prolin	Sigma Aldrich., St. Louis, USA

(S)-(-)- α,α -bis(3,5 bis(trifluormethyl)fenyl)-2-pyrolidinmethanol trimethylsilyl ether (95 %)	Sigma Aldrich., St. Louis, USA
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------

4.1.2 Separační materiály

Silikagel 60 (0,063-0,200 mm)	Merck, Darmstadt, Německo
TLC hliníkové desky 20x20 cm Silikagel 60	Merck, Darmstadt, Německo

4.1.3 Použité přístroje

Název přístroje	Program	Firma
Vysokotlaká chromatografie - Pumpa LCP 5020 - Spektrofotometrický detektor LCD 5000	Chromulan	Ignos, Praha, ČR
Varian UNITY INOVA-300	Varian UNITY	Varian, Palo Alto, USA
Magnetická míchačka IKA RCT basic	-	IKA, Německo
Vakuová odparka BUCHI rotovapor R-200	-	BUCHI, Curych, Švýcarsko
Analytické váhy A&D HR-200-C	-	Scientific Gear, Virginie, USA
UV lampa	-	Konrad Benda, Wiesloch, Německo

4.2 Metody

4.2.1 NMR spektroskopie

NMR spektroskopie byla použita jako metoda ověřující vznik produktu a k určení konverze reakce. Dále pak ke zjištění poměru diastereomerů v reakční směsi a k ověření čistoty produktu po přečištění.

Příprava vzorku

Malé množství vzorku, popřípadě reakční směsi (pro ^1H spektra 1-2 mg, pro ^{13}C 10-15 mg), bylo rozpuštěno v 0,6-0,8 ml deuterovaného chloroformu a kvantitativně přeneseno do NMR kyvety.

Měření vzorku

Všechna spektra byla měřena na přístroji Varian UNITYINOVA-300 (^1H při 299,94 MHz a ^{13}C při 75,43 MHz) v deuterovaném chloroformu. Přístroj byl laděn automaticky. Spektra ^1H byla měřena v rozsahu od -1,0 ppm do 11 ppm, po dobu 8 minut. U spekter ^{13}C byl rozsah -5 ppm až 220 ppm, všechna spektra byla měřena přes noc (10-12 hodin). Do kyvety nebyl přidáván vnitřní standard TMS, ale spektra byla referencována vůči chloroformu (pro ^1H signál chloroformu referencován na 7,26 ppm; pro ^{13}C signál chloroformu referencován na 77,23 ppm). U ^1H spekter byly jednotlivé plochy pod signály integrovány. Všechny chemické posuny u NMR specter (δ) uvedené v této práci jsou uvedeny v jednotkách ppm a všechny štěpící konstanty jsou uvedeny v hertzech [Hz].

Určení poměru diastereomerů produktů

Diastereomery mají různě odstíněná atomová jádra v magnetickém poli, a proto každý diastereomer vykazuje jiné NMR spektrum. Integrací ploch pod signály byl získán poměr diastereomerů v reakční směsi.

Ověření vzniku produktu a určení konverze reakce

30-60 μ l reakční směsi byly odebrány a rozpuštěny v deuterovaném chloroformu. Porovnáním spektra reakční směsi a spekter výchozích látek (popřípadě produktů) byla potvrzena přítomnost produktu v reakční směsi. Integrací plochy pod signály byla zjištěna konverze reakce.

4.2.2 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla použita pro oddělení produktu od ostatních látek v reakční směsi. Všechny sloupcové chromatografie byly prováděny na sloupci silikagelu v koloně o průměru 2 cm a délce 20 cm. Kolona byla naplněna silikagelem rozpuštěným v mobilní fázi. Jako mobilní fáze byla použita směs hexanu a ethyl-acetátu. Chromatografie byly prováděny v isokratickém uspořádání s průtokem přibližně 10 ml/min za sekundu. Jímané frakce měly objem 25 ml. Eluované frakce byly analyzovány metodou TLC.

4.2.3 Tentkovrstečná chromatografie (TLC)

Metoda TLC byla použita k analýze elučního profilu a k optimalizaci složení mobilní fáze pro kolonovou chromatografie.

Optimalizace složení mobilní fáze pro kolonovou chromatografii

Na tenkou vrstvu byly naneseny pomocí kapiláry všechny výchozí látky a reakční směs. Takto bylo připraveno několik tenkých desek, které byly vyvinuty v různě polárních soustavách (standardně směs hexan/ethyl-acetát v poměru 10:1, 5:1, 1:1 a čistý ethylacetát) k určení takové soustavy, ve které budou rozdíly retenčních faktorů výchozích látek produktů. Detekce na tenké desce byla provedena pomocí UV lampy.

4.2.4 Krystalizace

Krystaly byly získány rozpuštěním produktu při teplotě 50°C v isopropanolu, nasycený roztok byl ponechán samovolně krystalizovat za laboratorní teploty (7 dnů). Krystaly byly předány na rentgenovou strukturní analýzu. Tuto analýzu provedla RNDr. Ivana Císařová Csc. z katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

4.2.5 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC byla použita k určení enantioselektivní čistoty produktů na přístroji složeném z vysokotlaké pumpy Ingos LCP 5020, ze spektrofotometrického detektoru Ingos LCD 5000 a chirální kolony Chiralpak AD (column No. AD00CE-HD022; průměr kolony 0,46 cm, délka kolony 25 cm) od firmy ChiralPak[®]. Před každou analýzou byla kolona promývána po dobu 20 minut mobilní fází, v níž byla měřena analýza. Vzorek 3 mg byl rozpuštěn v isopropanolu (1 ml). Všechny analýzy byly při izokratickém uspořádání. Pro látky 4-7 (schema 9, látky 3a-3d) byla zvolena mobilní fáze heptan/isopropanol v poměru 90:10.

4. Výsledky

Z velkého počtu komerčně dostupných a zároveň často obchodovaných antidepresiv byl jako vhodný kandidát vybrán paroxetin. Jeho přípravou se zabývá řada prací, nicméně dosud nebyl na jeho přípravu aplikován organokatalytický koncept (využívající katalytických reakcí šetrných k životnímu prostředí). Použití tohoto konceptu na přípravu klíčového meziprojektu je nastíněno na retrosyntetickém schématu (schéma 5), který byl navržen a následně prozkoumán. Navržená syntéza je v souladu s ekonomicky preferovanou podmínkou snižování množství vedlejších produktů a produkcí odpadních látek (tzv. concept of atom economy).

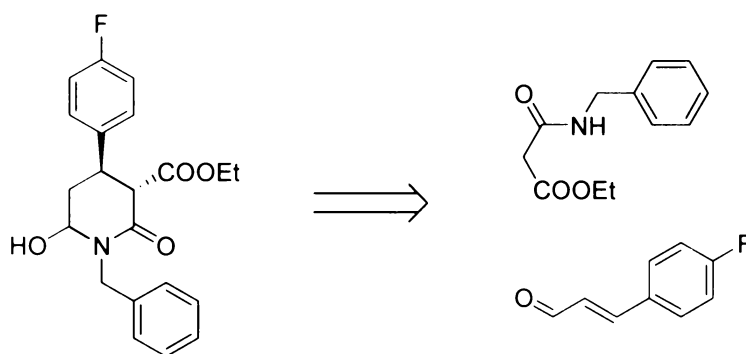


Schéma 5: Retrosyntéza klíčového meziprojektu při přípravě paroxetinu

Klíčovým produktem pro syntézu paroxetinu je substituovaný šestičlenný cyklus obsahující dusík (piperidinový derivát) (schéma 5). Reakce vedoucí z tohoto klíčového produktu k paroxetinu jsou známy z literatury [113].

Navržená tandemová reakce umožňuje vznik klíčového piperidinového derivátu pouze v jediném kroku. V první fázi navržené tandemové reakce je předpokládána aktivace α,β -nenasyceného aldehydu (schéma 5 červeně znázorněná látka) převedením na více reaktivní iminiový indermediát, který je následně atakován nukleofilem. Jako vhodný nukleofil byl vybrán ethyl 3-(benzylamino)-3-oxopropionát (schéma 5 modře znázorněná látka), který obsahuje ve své molekule nejen nukleofilní atom uhlíku, ale též nukleofilní atom dusíku ve formě primárního amidu. Právě dostatečně nukleofilní primární amid je nezbytný pro druhou fázi tandemové reakce, tj. ataku na elektrofilní karbonylovou

skupinu za vzniku šestičlenného cyklického produktu. Na zvýšení nuklefilního charakteru alfa-uhlíku byla v reakční směsi nezbytná přítomnost base. Předpokládaný mechanismus navržené tandemové reakce je znázorněn na schématu 6.

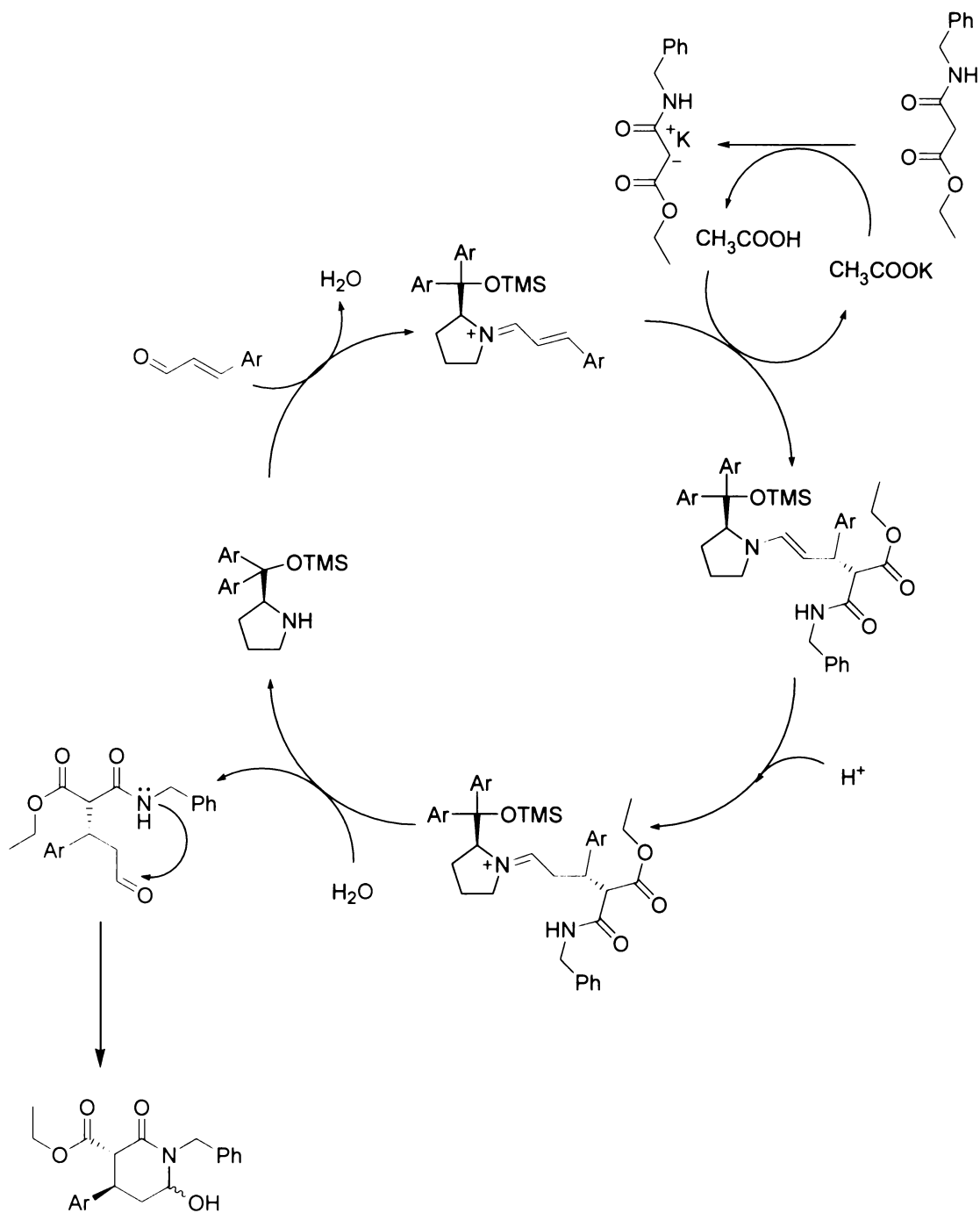
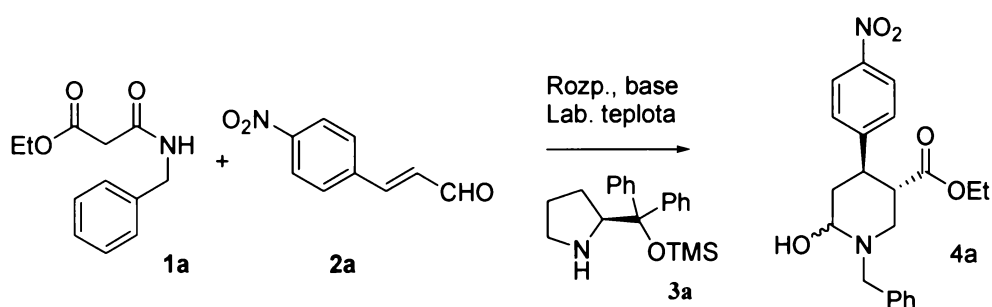


Schéma 6: Předpokládaný mechanismus navržené reakce. Jak lze vidět, v této reakci vzniká přednostně vždy pouze jeden ze dvou enantiomerů na uhlících 3 a 4.

Ověření navržené tandemové reakce bylo nejprve provedeno s 3-(4-nitrofenyl)-prop-2-enal, protože lze předpokládat, že přítomnost nitro skupiny působící I-efektem bude podporovat nukleofilní atak na β uhlík a bude tedy pravděpodobnější vznik produktu. S důrazem na výtěžek a enantioselektivitu reakce byl v prvních experimentech prozkoumán vliv rozpouštědla a typu base na průběh reakce (schéma 7, str. 51). Jako katalyzátor byl zvolen (S)-(-)- α,α -difenyl-2-pyrolidinmethanol trimethylsilyl ether, u nějž byl vysoký předpoklad aktivace α,β -nenasyceného aldehydu.

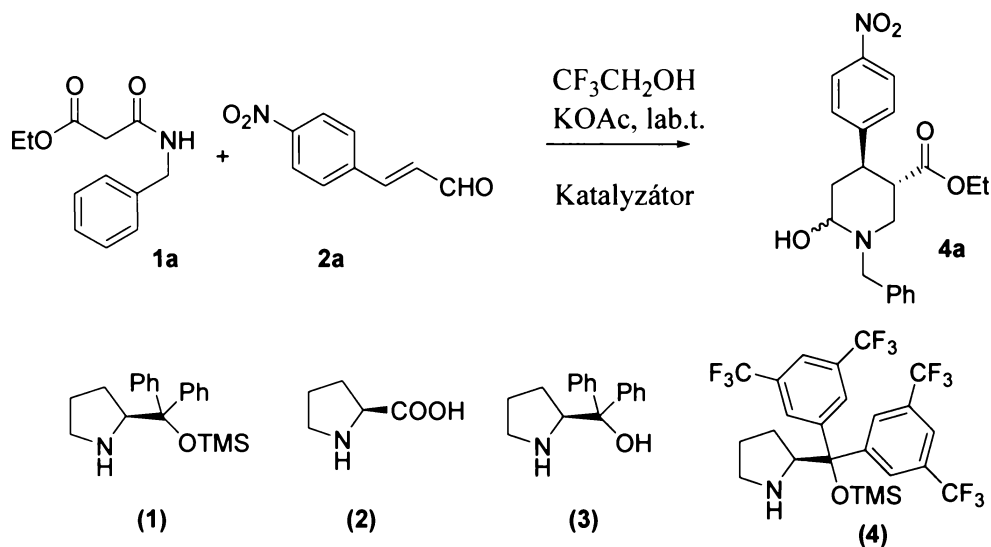


Vstup	Rozpouštědlo	Base	Výtěžek [%]	Dr ^a	ee [%] ^b
1	CDCl ₃		0		
2	CDCl ₃	Et ₃ N	0		
3	CDCl ₃	KOAc	stopy		
4	MeOH		0		
5	MeOH	KOAc	67	5:1	57
6	MeOH	Et ₃ N	86	5:1	74
7	MeOH ^c	KOAc	72	5:1	96
8	EtOH	KOAc	75	5:1	62
9	AcOEt	Et ₃ N	0		
10	Toluen	Et ₃ N	0		
11	CF ₃ CH ₂ OH	KOAc	92	5:1	95

Schéma 7: Vliv base a rozpouštědla na výtěžek a enantiosektivitu reakce Experimentální podmínky: Výchozí látky byly rozpuštěny v rozpouštědle (1 ml) v pořadí 3a (0,05 mmol), 2a (0,3 mmol), 1a (0,25 mmol) a base (0,25 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc. Produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií na silikagelu. a) určeno metodou NMR, b) určeno metodou HPLC, c) reakce byla prováděna za teploty 0°C.

Jak lze vidět z tabulky 1, reakce lépe probíhala v protických polárních rozpouštědlech (vstupy 5-8) než v rozpouštědlech aprotických a nepolárních (vstupy 1-3,9,10).

Nejlepšího výtěžku a nejlepšího enantioselektivního přebytku bylo dosaženo při použití vysoce polárního rozpouštědla 2,2,2-trifluorethanolu a base octanu draselného (vstup 11). Podle očekávání bylo při snížení teploty laboratorní na teplotu 0°C dosaženo vyšší enantioselektivity (vstup 7). Dále bylo nutné zjistit, který katalyzátor je pro tuto reakci nejvhodnější. Byly vyzkoušeny 4 komerčně dostupné katalyzátory. Informace jsou shrnuty ve schématu 8.

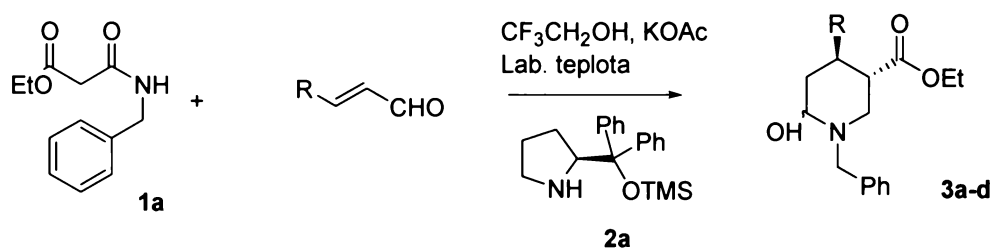


Vstup	Katalyzátory	Výtěžek [%]	Dr ^a	ee [%] ^b
1	(1)	92	5:1	95
2	(2)	76	5:1	22
3	(3)	0		
4	(4)	56	5:1	58

Schéma 8: Vliv katalyzátoru na výtěžek a enantioselektivitu. Experimentální podmínky: Výchozí látky byly rozpuštěny v 1 ml 2,2,2-trifluorethanolu v pořadí katalyzátor (0,05 mmol), **2a** (0,3 mmol), **1a** (0,25 mmol) a KOAc (0,25 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc. Produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií na silikagelu. a) Určeno metodou NMR, b) určeno metodou HPLC.

Jednoduše nejlepším katalyzátorem pro tuto reakci se ukázal být katalyzátor (S)-(-)- α,α -difenyl-2-pyrolidinmethanol trimethylsilyl ether (schéma 8 vstup 1, str. 52), reakce s ostatními katalyzátory poskytovaly nižší enantioselektivní přebytky i výtěžky.

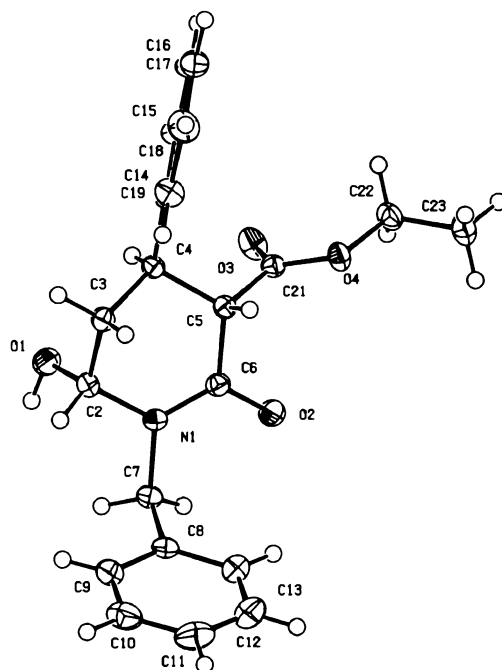
Dále bylo nutné ověřit verzatilitu reakce záměnou výchozích látek, aby mohla být reakce potažmo využita i při syntézách dalších látek. Záměna α,β -nenasyceného aldehydu byla prozkoumána na 4 aromatických aldehydech (schéma 9): 3-(4-nitrofenyl)-prop-2-enal (nitro skupina působí I- efektem), 3-naftyl-prop-2-enal (polyaromatický aldehyd), 3-fenyl prop-2-enal (bez indukčního efektu) a 3-(4-fluorofenyl)-prop-2-enal (fluor působí I+ efektem).



Vstup	Produkt	R	Výtěžek [%]	Dr ^a	ee [%] ^b
1	3a		92	5:1	95
2	3b		90	3:1	98
3	3c		86	3:1	99
4	3d		84	5:1	90

Schéma 9: Záměna výchozích látek. Experimentální podmínky: Výchozí látky byly rozpuštěny v 1 ml 2,2,2-trifluoethanolu v pořadí **2a** (0,05 mmol), α,β -nenasycený aldehyd (0,3 mmol), **1a** (0,25 mmol) a KOAc (0,25 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. a) určeno metodou NMR, b) určeno metodou HPLC.

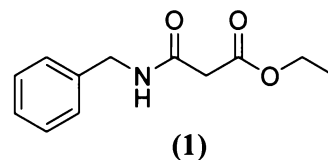
Vznik předpokládaného diastereomeru byl potvrzen rentgenovou strukturní analýzou produktu **3b** (schéma 9 str. 53; obr. 15) krystalovaného z isopropanolu (kapitola 4.2.4), neboť pomocí této metody lze určit relativní uspořádání atomů v molekule. (pozn.: Absolutní uspořádání atomů nebylo možné určit z důvodu nepřítomnosti atomu s vysokým hmotnostním číslem v připravené molekule. Bylo určeno chemickou korelací.)



Obr.15 Struktura produktu **3b** (schéma 9 str. 51) získaná pomocí rentgenové difrakce

Příprava ethyl 3-(benzylamino)-3-oxopropionátu (**1**)

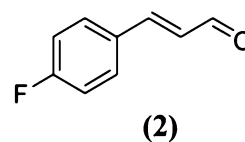
Ke směsi triethylaminu (1,85 g, 18,2 mmol) a benzylaminu (2,52 g, 24,9 mmol) v suchém dichlormethanu (25 ml) byl při laboratorní teplotě za intenzivního míchání přidán po



kapkách ethyl 3-chlor-3-oxopropionát (2,5 g, 16,6 mmol). Reakce byla následně míchána při stejné teplotě přes noc. Poté byla reakční směs zahuštěna oddestilováním rozpouštědla na vakuové odparce. Kolonovou chromatografií odparku na sloupci silikagelu (100 g) ve směsi hexan/ethyl-acetát (1:1) bylo získáno 3,02 g (82,2 %) látky **1**. Čistota produktu byla potvrzena pomocí ^1H NMR a MS spektra, které se shoduje s lit [114].

Příprava (E)-3-(4-fluorofenyl) prop-2-enalu (2)

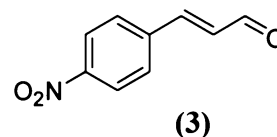
5,9 g (19,4 mmol) (trifenylfosforanyliden)acet aldehydu bylo rozpuštěno v 25 ml toluenu. Poté bylo přidáno 2 g (16,1 mmol) 4-fluor benzaldehydu. Směs byla intenzivně míchána a zahřívána



(65 °C) pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs zahuštěna na objem 10 ml na vakuové odparce. Kolonovou chromatografií odparku na sloupci silikagelu (150 g) ve směsi hexan/ethyl-acetát (5:1) bylo získáno 1,51 g (62,5 %) látky 2. Čistota produktu byla potvrzena pomocí ^1H NMR spektra, které se shoduje s lit [114].

Příprava (E)-3-(4-nitrofenyl) prop-2-enalu (3)

Směs 4,83 g (15,8 mmol) (trifenylfosforanyliden)acet aldehydu a 2g (13,3 mmol) 4-nitro benzaldehydu rozpuštěné v 15 ml toluenu byla zahřívána pod zpětným chladičem přes noc na 65 °C. Poté

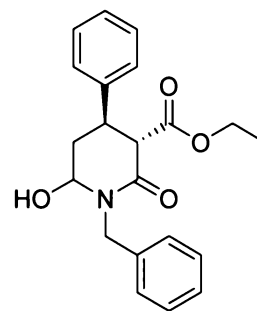


byla směs zahuštěna na vakuové odparce na 10 ml. Chromatografií odparku na sloupci silikagelu (200 g) ve směsi hexan/ethyl-acetát (5:1) bylo získáno 2,09 g (88,7 %) látky 3. Čistota produktu byla potvrzena pomocí ^1H NMR shodujícího se s údaji v literatuře [114].

Příprava (4R,3S) N-Benzyl-6-hydroxy-2-oxo-4-fenyl-piperidin-3-ethyl ester karboxylové kyseliny (4)

16 mg (0,05 mmol) (S)-(-)- α,α -difenyl-2-pyrrolidinmethanol trimethylsilyl etheru bylo rozpuštěno v 1 ml 2,2,2-triflorethanolu. Poté bylo přidáno 40 mg (0,3 mmol) E-3-fenyl prop-2-enalu, 55 mg (0,25 mmol) látky 1 a 24,5 mg (0,25 mmol) octanu draselného. Reakční směs byla intenzivně míchána. Po 24 hodinách bylo změřeno ^1H NMR spektrum k zjištění stupně konverze a poměru diastereomerů. Kolonovou chromatografií reakční směsi na sloupci silikagelu (50 g) ve směsi hexan/ethyl-acetát (1:1) bylo získáno 57 mg produktu s výtěžkem 90 %. Produkt byla průhledné amorfnní pevné látka. Část produktu byla krystalizována (kapitola 4.2.4)

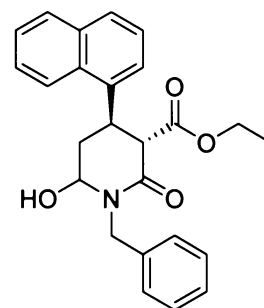
Produkt 2: $[\alpha]_D = +14,2^\circ$; bod tání $166,8^\circ\text{C}$; ^1H NMR (chloroform): 7,40-7,20 m, 10 H (H-arom; $\text{CH}_2\text{-Ph}$, $\text{N-CH}_2\text{-Ph}$); 5,13 d, 1 H, $J = 14,4$ (CHH-Ph); 5,82-5,03 dt, 1 H, $J_d=7,2$, $J_t=2,7$, (N-CH(OH)- CH_2); 4,45 d, 1 H, $J = 15,0$ (CHH-Ph); 4,12 q, 2 H, $J=7,2$ (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 3,85 td, 1 H, $J_d=3,9$, $J_t=12$ ($\text{CH}_2\text{-CH(Ph)-CH}$); 3,62 d, 1 H, $J=11,7$ ($\text{CH}_2\text{-CH(Ph)-CH}$); 2,78 t, 1 H, $J=7,2$ (-OH); 1,12 t, 3 H, $J=7,2$ (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); ^{13}C NMR: 170,1 (C-C(O)O- CH_2); 166,2 (C-C(O)-N); 140-126 (C-arom); 78,3 (C-OH); 61,5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 57,1 (N-C(O)-CH-C(O)-O); 47,8 (N $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 37,1 (C(OH)- $\text{CH}_2\text{-CH-Ph}$); 37,0 (C(OH)- $\text{CH}_2\text{-CH-Ph}$); 14,0 (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), Pro molekulu $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 353,4 a monoisotopická hmotnost 353,16. ESI hmotnostní spektroskopie m/z 376,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IČ spektroskopie: vlnočty $[\text{cm}^{-1}] = 3338, 3055, 3032, 2980, 2954, 2908, 2867, 1816, 1735, 1617$.



(4)

Příprava (4R,3S) N-Benzyl-6-hydroxy-2-oxo-4-β-naftyl-piperidin-3-ethyl ester karboxylové kyseliny (5)

16 mg (0,05 mmol) (S)-(-)-α,α-difenyl-2-pyrrolidinmethanol trimethylsilyl etheru bylo rozpuštěno v 1 ml 2,2,2-triflorethanolu. Poté bylo přidáno 40 mg (0,3 mmol) E-3-naftyl prop-2-enalu, 55 mg (0,25 mmol) látky 1 a 24,5 mg (0,25 mmol) octanu draselného. Reakční směs byla intenzivně míchána. Po 16 hodinách bylo změřeno ^1H NMR spektrum k zjištění stupně konverze a poměru diastereomerů. Kolonovou chromatografií reakční směsi na sloupci silikagelu (40 g) ve směsi hexan/ethyl-acetát (2:1) bylo získáno 88 mg produktu s výtěžkem 86 %. Produktem byla průhledná lehce nažloutlá amorfni pevná látka.



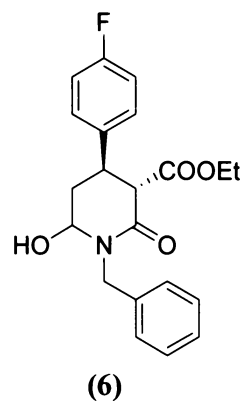
(5)

Produkt 3: $[\alpha]_D = +20,0^\circ$; bod tání $174,3^\circ\text{C}$; ^1H NMR (chloroform): 7,85-7,30 m, 12 H (H-arom; $\text{CH}_2\text{-Naftyl}$, $\text{N-CH}_2\text{-Ph}$); 5,17 d, 1 H, $J = 15$ (CHH-Ph); 5,82-5,03 m, 1 H, (N-CH(OH)- CH_2); 4,42 d, 1 H, $J = 15,0$ (CHH-Ph); 4,14-3,98 m, 3 H (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, $\text{CH}_2\text{-CH(naftyl)-CH}$); 3,75 d, 1 H, $J=11,4$ ($\text{CH}_2\text{-CH(Ph)-CH}$); 3,18 široký signál, 1 H (-OH);

1,05 t, 3 H, $J=7,5$ (O-CH₂-CH₃); ¹³C NMR: 170,1 (C-C(O)O-CH₂); 166,2 (C-C(O)-N); 138-125 (C-arom); 78,4 (C-OH); 61,6 (OCH₂CH₃); 56,86 (N-C(O)-CH-C(O)-O); 47,7 (N-CH₂-Ph); 37,1 (C(OH)-CH₂-CH-Ph); 37,0 (C(OH)-CH₂-CH-Ph); 13,9 (O-CH₂-CH₃) C₂₅H₂₅NO₄ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 403,47 a monoisotopická hmotnost 403,18. ESI hmotnostní spektroskopie m/z 426,1 [M+Na]⁺; IČ spektroskopie: vlnčet [cm⁻¹]=3307, 3047, 2986, 2937, 2910, 1741,1699, 1618. Část produktu byla zkrystalizována (kapitola 4.2.4).

Příprava (4R,3S) N-Benzyl-6-hydroxy-2-oxo-4-(4-fluorofenyl)-piperidin-3-ethyl ester karboxylové kyseliny (6)

V 1 ml 2,2,2-triflorethanolu bylo rozpuštěno v následujícím pořadí: 16 mg (0,05 mmol) (S)-(-)- α,α -difenyl-2-pyrolidinmethanol trimethylsilyl etheru, 37,5 mg (0,3 mmol) látky **2** 55 mg (0,25 mmol) látky **1** a 24,5 mg (0,25 mmol) octanu draselného. Reakční směs byla intenzivně míchána přes noc. Kolonovou chromatografií reakční směsi na sloupci silikagelu (40 g) ve směsi hexan/ethylacetát (1:2) bylo získáno 78 mg produktu s výtěžkem 84 %.



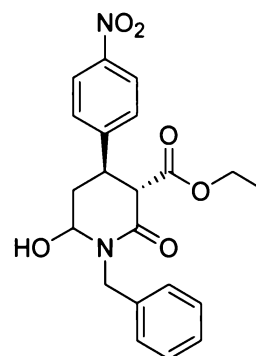
Produkt 3: $[\alpha]_D^{20} = +4,0^\circ$; ¹H NMR (chloroform): 7,36-7,10 m, 9 H (H-arom; CH₂-Ph-F, N-Ph); 5,10-5,00 m, 1H (N-CH(OH)-CH₂); 4,50-4,00 m, 6H; 3,80-3,60 m (C(O)-CH-C(O)), 2,20-2,00 m, 2H (C(OH)-CH₂-C(Ph)) 1,11 t, 3H, $J=7,9$ Hz (CH₂-CH₃) ¹³C NMR: 169,2 (C-C(O)O-CH₂); 164,6 (C-C(O)-N); 137,2 -128,5 (C-arom); 62,6 (C-OH), 56,7 (C(O)-CH-C(O)), 50,0 (N-CH₂-Ph), 41,9 (C(OH)-CH₂-CH-Ph), 14,7 (O-CH₂-CH₃). C₂₁H₂₁FNO₄ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 471,40 a monoisotopická hmotnost 371,15. ESI hmotnostní spektroskopie m/z 394,1 [M+Na]⁺;

Příprava (4R,3S) N-Benzyl-6-hydroxy-2-oxo-4-(4-nitrofenyl)-piperidin-3-ethyl ester karboxylové kyseliny (7)

V 1 ml 2,2,2-triflorethanolu bylo rozpuštěno v následujícím pořadí: 16 mg (0,05 mmol) (S)-(-)- α,α -difenyl-2-pyrolidinmethanol trimethylsilyl etheru, 53,7 mg (0,3 mmol) látky **3** 55 mg (0,25 mmol) látky **1** a 24,5 mg (0,25 mmol) octanu draselného. Reakční směs byla

intenzivně míchána přes noc. Kolonovou chromatografií reakční směsi na sloupci silikagelu (40 g) ve směsi hexan/ethyl-acetát (1:2) bylo získáno 91,6 mg produktu s výtěžkem 92 %.

Produkt 3: $[\alpha]_D = 20,0$; $^1\text{H NMR}$ (chloroform): 8,26 d, 2 H $J=8,8$ Hz, (**CH-C(NO₂)CH**); 7,48 d, 2 H $J=8,8$ Hz (**CH-CH-C(NO₂)CH-CH**); 7,44-7,37 m, 5H (**CH₂-Ph**); 4,43 d, 1 H, $J = 15$ (**CHH-Ph**); 4,30-4,10 d, 2 H $J=7,2$ (**CH₂-CH₃**); 3,72-3,66 m, 2 H (**N-CH(OH)-CH₂, CH₂-CH(Ar)-CH**); 4,42 d, 1 H, $J = 15,0$ (**CHH-Ph**); 4,14-3,98 m, 3 H (**O-CH₂-CH₃, CH₂-CH(naftyl)-**



(7)

CH); 2,30-2,12 m, 2 H (**C(OH)-CH₂-C(Ph)**); 1,05 t, 3 H, $J=7,2$ (**O-CH₂-CH₃**); $^{13}\text{C NMR}$: 169,6 (**C-C(O)O-CH₂**); 165,5 (**C-C(O)-N**); 148-124 (**C-Ar**); 78,0 (**C-OH**); 61,8 (**OCH₂CH₃**); 56,7 (**N-C(O)-CH-C(O)-O**); 48,0 (**NCH₂Ph**); 37,1 (**C(OH)-CH₂-CH-Ph**); 37,0 (**C(OH)-CH₂-CH-Ph**); 14,2(**OCH₂CH₃**) $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 398,41 a monoisotopická hmotnost 398,15. ESI hmotnostní spektroskopie m/z 421,13 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

5. Diskuse

Hlavním cílem této práce bylo navrzení syntézy paroxetinu, která by byla oproti stávajícím syntézám jednodušší a ekonomicky výhodnější. Aby bylo možné toto posoudit, byla prozkoumána řada prací a patentů, které se zabývají přípravou tohoto antidepresiva.

Jednoznačně nejdůležitějším kritériem při porovnávání syntetických konceptů je počet kroků syntézy, souhrnný výtěžek reakce a enantioselektivní čistota produktu.

Průměrný počet kroků potřebných pro syntézu paroxetinu nalezených v literatuře se pohyboval v rozmezí 12-14 [115-117]. Pouze v jedné práci byla nastíněna syntéza paroxetinu v 7 krocích [118] a v jedné ve 4 krocích [113]. Námi navržená syntéza sestávala pouze ze 4 kroků (schéma 10).

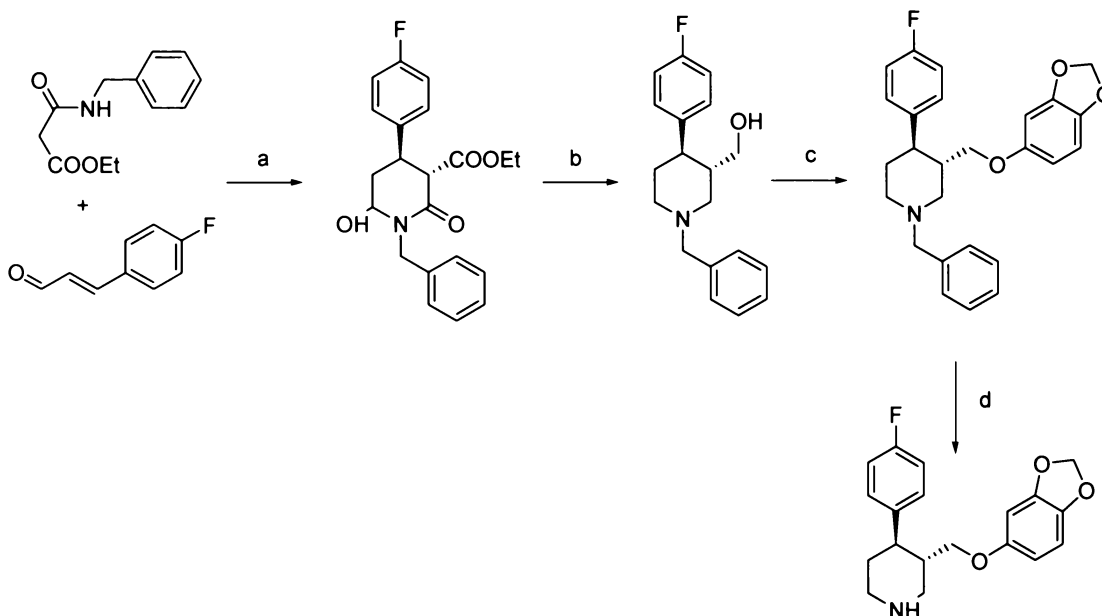


Schéma 10: Navržená formální syntéza paroxetinu: a) (S)-(-)- α,α -difenyl-2-pyrrolidinmethanol trimethylsilyl ether, AcOK, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$; b) BH_3 , THF; c) Mesylchlorid, sesamol; d) Na, NH_3 (Birchova reakce)

Syntéza klíčového produktu byla připravena s výborným výtěžkem (84%) a vysokou enantioselektivitou (90 % ee). V literatuře se souhrnný výtěžek k tomuto nebo podobnému klíčovému meziproductu pohyboval od 12 % [115] do 76 % [113] a enantioselektivita (ee) od 90 % [115] 99 % [119].

Ve většině prací zabývajících se přípravou paroxetinu byly použity reakce katalyzované těžkými kovy [113, 115, 117, 119]. Tato katalýza přináší řadu nevýhod oproti organické katalýze. Těžké kovy jsou podstatně toxičtější než katalyzátory používané při organické katalýze, je tedy absolutně nezbytné, aby byly při přípravě léčiv odstraněny z reakční směsi, což je v řadě případů problematické. Zároveň jsou při katalýze kovy kladeny vysoké nároky na inertnost prostředí, především na nepřítomnost vody, zatímco organokatalytické reakce jsou k malému množství vody tolerantní. Řada dalších prací ve své syntéze používá Grignardovu reakci [116, 120, 121]. Tato reakce ovšem také klade vysoké nároky na inertnost prostředí a přináší řadu obtíží při průmyslové výrobě. Organokatalytický koncept je jednoznačně výhodnější a jednodušší než koncept používající těžké kovy či Grignardova činidla.

Dalším z důležitých faktorů při posuzování reakcí jsou finanční náklady. V některých pracích byla nalezena řada vedlejších produktů syntézy, které ji činí méně ekonomickou [121], a v řadě dalších byly nalezeny energeticky nebo časově náročné reakce [115, 119]. Při navrhování syntézy byla snaha o minimalizaci tvorby vedlejších produktů a odpadních látek a zároveň časovou nenáročnost všech reakčních kroků.

6. Závěr

V této bakalářské práci byla rozebrána problematika související s depresivním onemocněním, prevalencí tohoto onemocnění, jeho dopad na společnost, sociální a biologické příčiny onemocnění, diagnóza a léčba především pomocí psychofarmak.

Prozkoumáním komerčně dostupných antidepresiv byl navržen paroxetin jako vhodný kandidát pro totální syntézu s organokatalytickým konceptem. Byla navržena jeho formální syntéza s použitím iminiové aktivace. Následně byla ověřena funkčnost syntézy přípravy meziprojektu – derivátu piperidinu. Syntéza paroxetinu z klíčového derivátu piperidinu je známa z literatury, proto její ověření nebylo předmětem této práce. Klíčový meziprojekt byl připraven s vynikajícím výtěžkem (84 %) a vysokou enantioselektivitou (90% ee). Porovnáním této syntézy se syntézami známými z literatury se jeví námi navržená syntéza vysoce ekonomickou, především z důvodů nízkého počtu vedlejších produktů a celkové časové nenáročnosti celé syntézy (nízký počet kroků a časová nenáročnost dílčích reakcí). Navíc je tato syntéza šetrná k životnímu prostředí. Námi navržená syntéza paroxetinu tedy splňuje všechny požadavky moderní organické syntézy, a proto byla ve formě krátkého sdělení již také publikována [122].

7. Použitá literatura

1. Costello, E.J., Pine, D.S., Hammen, C., March, J.S., Plotsky, P.M., Weissman, M.M., Biederman, J., Goldsmith, H.H., Kaufman, J., Lewinsohn, P.M., Hellander, M., Hoagwood, K., Koretz, D.S., Nelson, C.A., Leckman, J.F., *Development and natural history of mood disorders*. J Biol Psychiatry, 2002. **52**(6). 529-42.
2. Murray, C.J., Lopez, A.D., *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9064). 1498-504.
3. *World Health Organization*. 2009 [citováno 2009 21.2.]; dostupné z: http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/.
4. Greenberg, P.E., Kessler, R.C., Birnbaum, H.G., Leong, S.A., Lowe, S.W., Berglund, P.A., Corey-Lisle, P.K., *The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000?* J Clin Psychiatry, 2003. **64**(12). 1465-75.
5. Hippocrates, *Aforismy* 1993: SPN
6. Lieberman, J.A., *History of the Use of Antidepressants in Primary Care*. J Clin Psychiatry, 2003. **5**. 6-10.
7. Kandel, E.R., Schwartz J., Jessell T. M., *Principles of neural science*. 4. ed. 2000: McGraw-Hill Professional.
8. Rose, R., *Jacob's Ladder (part 2)*. 2009 [citováno 2009 31.3]; dostupné z: http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.tatfoundation.org/synapse2.jpg&imgrefurl=http://tatfoundation.org/forum2005-03.htm&usq=__afeXTiwPtfJyavDMbBafrd_qddQ=&h=440&w=400&sz=19&hl=cs&start=1&um=1&tbnid=e3ZYrmM1X0UeqM:&tbnh=127&tbnw=115&prev=/images%3Fq%3Dneural%2Bsynapses%26hl%3Dcs%26client%3Dfirefox-a%26rls%3Dorg.mozilla:en-US:official%26hs%3DZjZ%26sa%3DN%26um%3D1.
9. Llinas, R., Steinberg, I.Z., Walton, K., *Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse*. Biophys J, 1981. **33**(3). 323-51.
10. Valtorta, F., Benfenati, F., Greengard, P., *Structure and function of the synapsins*. J Biol Chem, 1992. **267**(11). 7195-8.
11. Augustine, G.J., Charlton, M.P., *Calcium dependence of presynaptic calcium current and post-synaptic response at the squid giant synapse*. J Physiol, 1986. **381**. 619-40.
12. Miller, R.J., *Presynaptic receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**. 201-227.
13. Krnjevic, K., *Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates*. Phys revs, 1974. **54**(2). 418-540.
14. Meyers, R.A., *Neurobiology: From molecular basis to disease* 2008: Wiley-VCH.
15. Aidley, D.J., *The physiology of excitable cells*. 4 ed. 1998: Cambridge university press.
16. Robinson, J.D., *Mechanisms of synaptic transmission: bridging the gaps (1890-1990)*. ilustrovaná ed. 2001: Oxford Unifersity Press US.

17. Masson, J., Sagne, C., Hamon, M.E., Mestikawy, S., *Neurotransmitter transporters in the central nervous system*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(3). 439-64.
18. Giros, B., Wang, Y.M., Suter, S., McLeskey, S.B., Pifl, C., Caron, M.G., *Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters*. J Biol Chem, 1994. **269**(23). 15985-8.
19. Melikian, H.E., *Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation*. Pharmacol Ther, 2004. **104**(1). 17-27.
20. Danbolt, N.C., *The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain*. Prog Neurobiol, 1994. **44**(4). 377-96.
21. Maddux J.E., Winstead, B.A., *Psychopathology: Foundations for a Contemporary Understanding*. ilustrovaná ed. 2005: Routledge.
22. Gotlib I.H., Hammen.C.L., *Handbook of depression*. ilustrovaná ed. 2002: Guilford Press.
23. Praško J, Hovorka J., *Dysthymia and its therapy*. Psych pro praxi, 2002. **6**. 265-270.
24. Paykel, E.S., Tylee, A., Wright, A., Priest, R.G., Rix, S., Hart, D., *The Defeat Depression Campaign: psychiatry in the public arena*. Am J Psychiatry, 1997. **154**(6 Suppl). 59-65.
25. Jiráček, R., *Depression in the elderly - biological and psychosocial influence, relation of depression and dementia*. Psych pro praxi, 2007. **8**(5). 198-200.
26. Palazidou E., *Depression*. 2002: Elsevier Health Sciences.
27. Gater, R., Tansella, M., Korten, A., Tiemens, B.G., Mavreas, V.G., Olatawura, M.O., *Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(5). 405-13.
28. Ciraulo D.A., Shader R.I., *Pharmacotherapy of Depression: Application for the Outpatient Practitioner*. 2004: Humana press.
29. Kendler, K.S., Gatz, M., Gardner, C.O., Pedersen, N.L., *A Swedish national twin study of lifetime major depression*. Am J Psychiatry, 2006. **163**(1). 109-14.
30. Kessler, R.C., McGonagle, K.A., Swartz, M., Blazer, D.G., Nelson, C.B., *Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence*. J Affect Disord, 1993. **29**(2-3). 85-96.
31. Nazroo, J.Y., Edwards, A.C., Brown, G.W., *Gender differences in the onset of depression following a shared life event: a study of couples*. Psychol Med, 1997. **27**(1). 9-19.
32. Bebbington, P.E., *Sex and depression*. Psychol Med, 1998. **28**(1). 1-8.
33. Craig, T.K.J., *Adversity and depression*. Intern Rev of Psych, 1996. **8**. 341-353.
34. Hanninen, V., Aro, H., *Sex differences in coping and depression among young adults*. Soc Sci Med, 1996. **43**(10). 1453-60.
35. Kendler, K.S., Prescott, C.A., *A population-based twin study of lifetime major depression in men and women*. Arch Gen Psychiatry, 1999. **56**(1). 39-44.
36. Weiss, E.L., Longhurst, J.G., Mazure, C.M., *Childhood sexual abuse as a risk factor for depression in women: psychosocial and neurobiological correlates*. Am J Psychiatry, 1999. **156**(6). 816-28.

37. Staley, J.K., Sanacora, G., Tamagnan, G., Maciejewski, P.K., Malison, R.T., Berman, R.M., Vythilingam, M., Kugaya, A., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Charney, D., Innis, R.B., *Sex differences in diencephalon serotonin transporter availability in major depression*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(1). 40-7.
38. Mays M., Croake, J.W., *Treatment of depression in managed care*. 1997: Psychology press.
39. Baumel, S., *Dealing with depression naturally: complementary and alternative therapies for restoring emotional health*. 2000: McGraw-Hill.
40. Coyne, J.C., Downey, G., *Social factors and psychopathology: stress, social support, and coping processes*. Annu Rev Psychol, 1991. **42**. 401-25.
41. Levitan, R.D., Parikh, S.V., Lesage, A.D., Hegadoren, K.M., Adams, M., Kennedy, S.H., Goering, P.N., *Major depression in individuals with a history of childhood physical or sexual abuse: relationship to neurovegetative features, mania, and gender*. Am J Psychiatry, 1998. **155**(12). 1746-52.
42. Bottomley, A., *Depression in cancer patients: a literature review*. Eur J Cancer Care (Engl), 1998. **7**(3). 181-91.
43. Glassman, A.H., Shapiro, P.A., *Depression and the course of coronary artery disease*. Am J Psychiatry, 1998. **155**(1). 4-11.
44. Whisman, M.A., *Marital adjustment and outcome following treatments for depression*. J Consult Clin Psychol, 2001. **69**(1). 125-9.
45. O'Hara, M.W., Schlechte, J.A., Lewis, D.A., Varner, M.W., *Controlled prospective study of postpartum mood disorders: psychological, environmental, and hormonal variables*. J Abnorm Psychol, 1991. **100**(1). 63-73.
46. Kendler, K.S., Kessler, R.C., Walters, E.E., MacLean, C., Neale, M.C., Heath, A.C., Eaves, L.J., *Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women*. Am J Psychiatry, 1995. **152**(6). 833-42.
47. Sullivan, P.F., Neale, M.C., Kendler, K.S., *Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(10). 1552-62.
48. Levinson, D.F., *The genetics of depression: a review*. Biol Psychiatry, 2006. **60**(2). 84-92.
49. Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., *Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene*. Science, 2003. **301**(5631). 386-9.
50. Kendler, K.S., Kuhn, J.W., Vittum, J., Prescott, C.A., Riley, B., *The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication*. Arch Gen Psychiatry, 2005. **62**(5). 529-35.
51. Rotenberg, V.S., *The revised monoamine hypothesis: mechanism of antidepressant treatment in the context of behavior*. Integr Physiol Behav Sci, 1994. **29**(2). 182-8.
52. Owens, M.J., Nemeroff C.B., *Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter*. Clin chem, 1994. **40**(2). 288-295.
53. Hindmarch, I., *Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods*. Eur Psychiatry, 2002. **17 Suppl 3**. 294-9.

54. Lacasse, J.R., Leo, J., *Serotonin and depression: a disconnect between the advertisements and the scientific literature*. PLoS Med, 2005. **2**(12). e392.
55. Pineyro, G., Blier, P., *Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(3). 533-91.
56. Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., *Neurobiology of depression*. Neuron, 2002. **34**(1). 13-25.
57. Kang, H., Schuman, E.M., *Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus*. Science, 1995. **267**(5204). 1658-62.
58. Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R.S., *Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments*. J Neurosci, 1995. **15**(11). 7539-47.
59. Dwivedi, Y., Rao, J.S., Rizavi, H.S., Kotowski, J., Conley, R.R., Roberts, R.C., Tamminga, C.A., Pandey, G.N., *Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects*. Arch Gen Psychiatry, 2003. **60**(3). 273-82.
60. Wallace, T.L., Stellitano, K.E., Neve, R.L., Duman, R.S., *Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(3). 151-60.
61. Dowlatshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T., *Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression*. Lancet, 1998. **352**(9142). 1754-5.
62. Murer, M.G., Yan, Q., Raisman-Vozari, R., *Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. Prog Neurobiol, 2001. **63**(1). 71-124.
63. Videbech, P., Ravnikilde, B., *Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies*. Am J Psychiatry, 2004. **161**(11). 1957-66.
64. MacQueen, G.M., Campbell, S., McEwen, B.S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R.T., Nahmias, C., Young, L.T., *Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3). 1387-92.
65. Thakker-Varia, S., Alder, J., *Neuropeptides in depression: role of VGF*. Behav Brain Res, 2009. **197**(2). 262-78.
66. Balzac, F., *A Neurotrophic Hypothesis of Depression and AntiDepressant Response* Neuropsychiatry, 2007. **8**(7).
67. Dias, B.G., Banerjee, S.B., Duman, R.S., Vaidya, V.A., *Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain*. Neuropharmacology, 2003. **45**(4). 553-63.
68. Altieri, M., Marini, F., Arban, R., Vitulli, G., Jansson, B.O., *Expression analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA isoforms after chronic and acute antidepressant treatment*. Brain Res, 2004. **1000**(1-2). 148-55.
69. Miro, X., Perez-Torres, S., Artigas, F., Puigdomenech, P., Palacios, J.M., Mengod, G., *Regulation of cAMP phosphodiesterase mRNAs expression in rat brain by acute and chronic fluoxetine treatment. An in situ hybridization study*. Neuropharmacology, 2002. **43**(7). 1148-57.

70. Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., Monteggia, L.M., Self, D.W., Nestler, E.J., *Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress*. *Science*, 2006. **311**(5762). 864-8.
71. Hinson, J., Raven P., Chew S.L., *The endocrine system*. ilustrovaná ed. 2007: Elsevier Health Sciences.
72. Conn P.M., Melmed, S., *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. 1997: Humana Press.
73. Scott L.V., Dinan T.G., *Vasopression and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression*. *Life Sciences*, 1998. **62**(22). 1985-1998.
74. Nemeroff, C.B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T., Vale, W., *Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients*. *Science*, 1984. **226**(4680). 1342-4.
75. Holsboer, F., *The corticosteroid receptor hypothesis of depression*. *Neuropsychopharmacology*, 2000. **23**(5). 477-501.
76. McEwen, B.S., *Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology*. *Neuropsychopharm*, 2000. **22**(2). 108-24.
77. Cook, S.C., Wellman, C.L., *Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex*. *J Neurobiol*, 2004. **60**(2). 236-48.
78. Pittenger, C., Duman, R.S., *Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms*. *Neuropsychopharmacology*, 2008. **33**(1). 88-109.
79. Weinhold, B., *Epigenetics: the science of change*. *Environ Health Perspect*, 2006. **114**(3). A160-7.
80. Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., Nestler, E.J., *Epigenetic regulation in psychiatric disorders*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(5). 355-67.
81. Bird, A.P., Wolffe, A.P., *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. *Cell*, 1999. **99**(5). 451-4.
82. Szyf, M., Weaver, I., Meaney, M., *Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior*. *Reprod Toxicol*, 2007. **24**(1). 9-19.
83. Weaver, I.C., Meaney, M.J., Szyf, M., *Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(9). 3480-5.
84. Narlikar, G.J., Fan, H.Y., Kingston, R.E., *Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription*. *Cell*, 2002. **108**(4). 475-87.
85. Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L., Nestler, E.J., *Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(4). 519-25.
86. Krishnan, V., Nestler, E.J., *The molecular neurobiology of depression*. *Nature*, 2008. **455**(7215). 894-902.
87. Dawson, R., Lavori, P.W., Coryell, W.H., Endicott, J., Keller, M.B., *Course of treatment received by depressed patients*. *J Psychiatr Res*, 1999. **33**(3). 233-42.
88. Olfson, M., Marcus, S.C., Pincus, H.A., *Trends in office-based psychiatric practice*. *Am J Psychiatry*, 1999. **156**(3). 451-7.
89. Zajecka, J.M., *Treating depression to remission*. *J Clin Psychiatry*, 2003. **64 Suppl 15**. 7-12.

90. Keller, M.B., McCullough, J.P., Klein, D.N., Arnow, B., Dunner, D.L., Gelenberg, A.J., Markowitz, J.C., Nemeroff, C.B., Russell, J.M., Thase, M.E., Trivedi, M.H., Zajecka, J., *A comparison of nefazodone, the cognitive behavioral-analysis system of psychotherapy, and their combination for the treatment of chronic depression.* N Engl J Med, 2000. **342**(20). 1462-70.
91. Smith., P., *Psychotherapy.* 1999: Routledge.
92. Scott, A.I.F., *The ECT Handbook.* Second ed. 2004: Royal College of Psychiatrists.
93. Lisanby, S.H., Maddox, J.H., Prudic, J., Devanand, D.P., Sackeim, H.A., *The effects of electroconvulsive therapy on memory of autobiographical and public events.* Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(6). 581-90.
94. Shah N., Farrell M., Raeder C., *An overview of SSRIs for treatment of depression.* J Pharm Soc Wis, 1999. **July/August.** 33-46.
95. Alarcón R. D., Feighner J.P., Stanga C.Y., Ross R., *Antidepressants.* 2004: Springer.
96. IMS. *The Pharma Report 2008: The Top 20 Pharma Companies.* 2008 [citováno 2009 8.4.]; dostupné z: http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth/template.MAXIMIZE/menuitem.c0503dcec4d63d44f43fd6819418c22a/?javax.portlet.tpst=036e229cd1d3bc44f43fd6819418c22a_ws_MX&javax.portlet.prp_036e229cd1d3bc44f43fd6819418c22a_viewID=merged_results&javax.portlet.begCacheTok=com.vignette.cachetoken&javax.portlet.endCacheTok=com.vignette.cachetoken.
97. Katzung, B.G., *Basic & clinical pharmacology.* 10. ed. 2007: McGraw-Hill Professional.
98. Rang H.P., Dale, M.M., Ritter J.M., *Pharmacology 5. ed.* 2003: Elsevier.
99. Stahl, M.S., *Psychopharmacology of antidepressants.* 1997: Informa Health Care.
100. Buschmann H., Párraga A., Torrens A., Díaz J.L., Vela J.M., *Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics: From Chemistry and Pharmacology to Clinical Application.* 2007: Wiley.
101. Hansen, R.A., Gartlehner, G., Lohr, K.N., Gaynes, B.N., Carey, T.S., *Efficacy and safety of second-generation antidepressants in the treatment of major depressive disorder.* Ann Intern Med, 2005. **143**(6). 415-26.
102. Bourin, M., Chue, P., Guillon, Y., *Paroxetine: a review.* CNS Drug Rev, 2001. **7**(1). 25-47.
103. Petersen F., Amstutz.R., *Natural compounds as drugs.* 2008: Birkhäuser.
104. Nicolaou, K.C., Vourloumis, D., Winssinger, N., Baran, P.S., *The Art and Science of Total Synthesis at the Dawn of the Twenty-First Century.* Angew Chem Int Ed Engl, 2000. **39**(1). 44-122.
105. Woodward, R.B., *The total synthesis of vitamin B 12.* Pure Appl Chem, 1973. **33**(1). 145-77.
106. List B., Lerner, R.A., Barbas C.F, *Proline-Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reactions.* J Am Chem Soc, 2000. **122**(10). 2395-2396.
107. Ahrendt A., Borths, C.J., MacMillan D.W.C., *New Strategies for Organic Catalysis: The First Highly Enantioselective Organocatalytic Diels-Alder Reaction.* J Am Chem Soc, 2000. **122**(17). 4243-4244.
108. Figueiredo R.M., Christmann, M., *Organocatalytic Synthesis of Drugs and Bioactive Natural Products.* Eur J Org Chem, 2007. **16.** 2575-2600.

109. Dalko, P.I., *Enantioselective organocatalysis: reactions and experimental procedures*. 2007: Wiley-VCH.
110. Hajos. Z.G, Parrish, D.R., *Asymmetric synthesis of bicyclic intermediates of natural product chemistry*. J. Org. Chem, 1974. **39**(12). 1615-1621.
111. Franzen, J., Marigo, M., Fielenbach, D., Wabnitz, T.C., Kjaersgaard, A., Jorgensen, K.A., *A general organocatalyst for direct alpha-functionalization of aldehydes: stereoselective C-C, C-N, C-F, C-Br, and C-S bond-forming reactions. Scope and mechanistic insights*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(51). 18296-304.
112. Graham, T.H., Jones, C.M., Jui, N.T., Macmillan, D.W.C., *Enantioselective Organo-Singly Occupied Molecular Orbital Catalysis: The Carbo-oxidation of Styrenes*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(49). 16494-5.
113. Ferrera L., Massandro, P., Cignarella, G., *Process for the preparation of 3-substituted 4-phenyl-piperidine derivative*. 23.9.2002, Chemi S.p.A.: USA. 10., US Patent 6444822
114. Franke, P.T., Richter, B., Jorgensen, K.A., *Organocatalytic asymmetric synthesis of functionalized 3,4-dihydropyran derivatives*. Chemistry, 2008. **14**(21). 6317-21.
115. Liu L., Huanq, H., Hong P., Chen S., *Practical syntheses of chiral trans-3, 4-disubstituted piperidines and the intermediates*. 25.12.2002, Development center for biotechnology: USA. 9., US patent 6833458
116. Czibula L., Sebök F., Szántay C., Mák M., *A Convenient Synthesis of (-)-Paroxetine*. Eur J Org Chem, 2004(15). 3336-3339.
117. Cossy J., Pardo D., Desmurs J., *A short formal synthesis of paroxetine. Diastereoselective cuprate addition to a chiral racemic olefinic amido ester*. Tetrahedron letters, 2001. **42**. 7805-7807.
118. Takasu, K., Nishida, N., Tomimura, A., Ihara, M., *Convenient synthesis of substituted piperidinones from alpha,beta-unsaturated amides: formal synthesis of deplancheine, tacamonine, and paroxetine*. J Org Chem, 2005. **70**(10). 3957-62.
119. Yamada S., Jahan, I., *A new route to 3,4-disubstituted piperidines: formal synthesis of (-)-paroxetine and (+)-femoxetine*. Tetrahedron letters, 2005. **46**. 8673-8676.
120. Murthy K., Rey, A., Tjepkema M., *Enantioselective synthesis of 3-substituted-4-aryl piperidines useful for the preparation of paroxetine*. Tetrahedron letters, 2003(44). 5355-5358.
121. Risi C., Fanton, G., Pollini G., Trapella C., Calente F., Zanirato V., *Recent advances in the stereoselective synthesis of trans-3,4-disubstituted-piperidines: applications to (-)-paroxetine*. Tetrahedron: Asymmetry, 2008(19). 131-155.
122. Valero G., Schimer, J., Cisarova I., Vesely J. Moyano A., Rios R., *Highly enantioselective organocatalytic synthesis of piperidines. Formal synthesis of (-)-Paroxetine*. Tetrahedron letters, 2009. **50**(17). 1943-1946.

