

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



TEORETICKÉ STUDIUM INTERAKCE XENOBIOTIK S MEMBRÁNAMI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Jiří Prokop
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Michal Otyepka, Ph.D.
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Fyzikální chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně a čerpal jen z pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 7. 5. 2015

.....

Jiří Prokop

Poděkování patří všem pracovníkům Katedry fyzikální chemie PřF UP v Olomouci za rady, podněty a připomínky, které mi pomohly vypracovat tuto práci.

Poděkování patří především prof. RNDr. Michalu Otyepkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Markétě Paloncýové za odborné vedení a pomoc s programem COSMOtherm. RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D. za rady spojené s vložením obtížnějších struktur do programu COSMO.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora	Jiří Prokop
Název práce	Teoretické studium interakce xenobiotik s membránami
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce	prof. RNDr. Michal Otyepka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Cytochromy P450 se z velké části podílí na biotransformaci cizorodých látek v lidském organismu. Jednotlivé formy cytochromu P450, které se podílí na biotransformačních procesech, jsou poměrně promiskuitní z hlediska substrátové specifity. Řada substrátů jsou amfifilní látky, které se mohou akumulovat v membránách. Cílem práce bylo posoudit, kde a s jakou afinitou se v membránách nachází substráty a odpovídající metabolity, které vzniknou po katalýze cytochromem P450. V současnosti nejsou spočítané hodnoty partičních koeficientů membrána-voda všech známých metabolitů šesti hlavních cytochromů P450 (3A4, 2C9, 2C19, 2D6, 1A2 a 2E1). Partiční koeficienty je možné získat pomocí celé řady metod a my jsme se rozhodli použít program COSMOmic pro porovnání těchto koeficientů. V naší studii srovnáváme partiční koeficienty, pozice minim a hodnoty penetrační bariéry třiceti substrátů s jejich metabolity. V některých případech jsme také kontrolovali, zda odlišná stereoizomerie nemůže ovlivnit výše zmíněné vlastnosti xenobiotik. Novinkou našeho přístupu je použití programu COSMOmic, což je program založený na kvantově-chemických výpočtech a algoritmu statistické termodynamiky. Z celkového počtu 134 párů metabolit-substrát má 67 % metabolitů nižší afinitu k membráně než jejich substrát. Nejpočetnější studovanou skupinou metabolitů je skupina hydroxyderivátů čítající 61 metabolitů. Hodnotu partičního koeficientu může významně ovlivnit i poloha substituované skupiny (hydroxylová funkční skupina u metabolitů ondansetronu nebo atorvastatinu).

Klíčová slova	xenobiotika, membrána, partiční koeficient, COSMOmic, afinita
Počet stran	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author's first name and surname	Jiří Prokop
Title	Theoretical Study on Interaction of Xenobiotics with Membranes
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
Supervisor	prof. RNDr. Michal Otyepka, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

Cytochromes P450 play a key role in biotransformation of xenobiotics in the human body. Some cytochromes P450 that take place in biotransformation processes are quite promiscuous in case of specific substrates. Many substrates are amphiphilic molecules and these molecules are accumulated in the membranes. The objective of this work was to evaluate affinity and position in the membrane of studied substrates metabolized by cytochromes P450 and their metabolites. Nowadays, membrane-water partition coefficients for all known metabolites of six major cytochromes P450 (3A4, 2C9, 2C19, 2D6, 1A2 and 2E1) are not calculated. It is possible to get the partition coefficients by many kinds of methods and we decided to use COSMOmic program to compare these coefficients with each other. Our approach consists of comparison of thirty cytochromes P450 substrates with their known metabolites. In some cases we also checked whether different stereoisomerism of xenobiotics would change their partition coefficients, membrane affinities, penetration barriers and positions of minima (free energy) from the center of the membrane. The novel insight of our approach is using program COSMOmic, which is based on quantum-chemical calculations and a statistical thermodynamic algorithm. This algorithm is used for pairing of interacting surfaces. We observed that in 67 % of 134 totally studied metabolite-substrate pairs metabolites have lesser affinity to the membrane than the corresponding substrates. The largest group of studied metabolites is composed of 61 hydroxy metabolites. The value of partition coefficient can be strongly influenced by the position of substituted group (e.g. hydroxyl group of ondansetron or atorvastatin metabolites).

Keywords	xenobiotics, membrane, partition coefficient, affinity, COSMOmic
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Úvod.....	17
2. Teoretická část	19
2.1 Cytochromy P450.....	19
2.1.1 CYP3A4	19
2.1.2 CYP1A2	19
2.1.3 CYP2D6	20
2.1.4 CYP2C.....	20
2.1.5 CYP2E1	21
2.2 Buněčné membrány.....	21
2.2.1 Lipidy a jejich kategorie	22
2.2.1.1 Mastné kyseliny	22
2.2.1.2 Glycerolipidy	23
2.2.1.3 Glycerofosfolipidy (fosfolipidy).....	23
2.2.1.4 Sfingolipidy	24
2.2.1.5 Steroly.....	24
2.2.1.6 Prenoly	25
2.2.1.7 Sacharolipidy	25
2.2.1.8 Polyketidy	26
2.3 Farmakokinetika.....	26
2.4 ADME podávaných xenobiotik.....	26
2.4.1 Absorpce.....	26
2.4.1.1 Vazba léčiv na proteiny v plazmě.....	26
2.4.2 Distribuce, eliminace	27
2.4.2.1 Pasivní průchod přes buněčnou membránu	28
2.4.2.2 Průchod přes buněčnou membránu v programu COSMOmic	28
2.5 Použité programy a metody	29

2.5.1 COSMO	29
2.5.2 COSMOtherm	31
2.5.3 COSMOmic	32
3. Experimentální část	35
3.1 Přehled studovaných systémů	35
3.2 Výpočet partičního koeficientu	35
3.3 Srovnání partičních koeficientů	36
3.3.1 Skupina warfarinu	37
3.3.2 Skupina omeprazolu	38
3.3.3 Skupina propranololu	39
3.3.4 Skupina estradiolu (17-beta-estradiolu)	40
3.3.5. Skupina acetaminofenu (paracetamolu)	40
3.3.6 Skupina alprazolamu	41
3.3.7 Skupina alfentanilu	42
3.3.8 Skupina antipyrinu	42
3.3.9 Skupina atorvastatinu	43
3.3.10 Skupina buprenorfinu	44
3.3.11 Skupina kofeinu	44
3.3.12 Skupina citalopramu	45
3.3.13 Skupina clarithromycinu	46
3.3.14 Skupina diazepamu	46
3.3.15 Skupina diklofenaku	47
3.3.16 Skupina dronabinolu	48
3.3.17 Skupina glyburidu (glibenklamidu)	49
3.3.18 Skupina fluoxetinu	50
3.3.19 Skupina nevirapinu (nevaripinu)	50
3.3.20 Skupina lovastatinu	51

3.3.21 Skupina paklitaxelu (taxolu).....	51
3.3.22 Skupina lidokainu	52
3.3.23 Skupina meloxikamu	52
3.3.24 Skupina nortriptylinu	53
3.3.25 Skupina losartanu	54
3.3.26 Skupina tretinoinu	55
3.3.27 Skupina midazolamu	55
3.3.28 Skupina ondansetronu	56
3.3.29 Skupina sevofluranu	57
3.3.30 Skupina paroxetinu	57
4. Diskuze	59
5. Závěr	62
6. Summary	64
7. Seznam literatury	66

1. Úvod

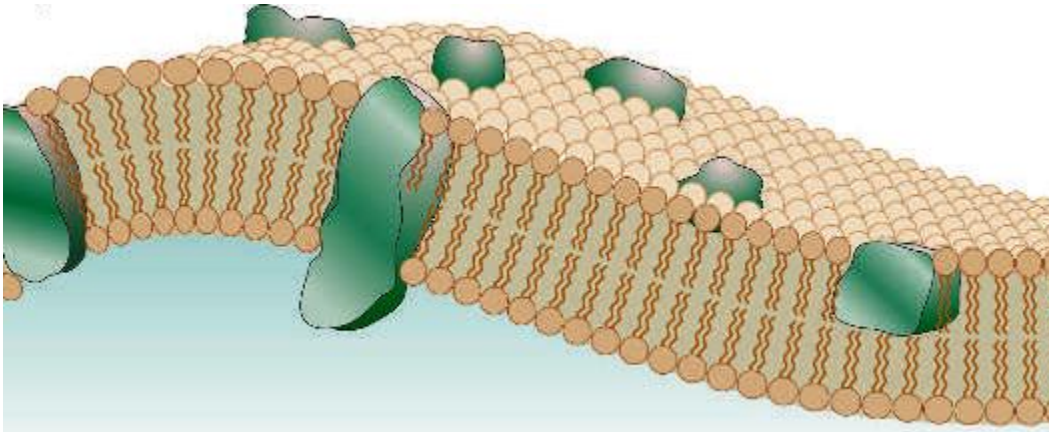
Teoretické studium interakcí xenobiotik s membránou je důležité pro objasnění jejich farmakokinetiky, zadržování v organismu a sekreci^{1,2}. Naše studium se zabývá srovnáním partičních koeficientů, penetračních bariér a pozic minim léčiv a jejich metabolitů. Z hodnot partičních koeficientů můžeme srovnat, jestli má léčivo vyšší afinitu k membráně než jeho metabolit nebo naopak. Pomocí hodnoty penetrační bariéry můžeme zjistit, jak snadno prochází studované léčivo (popř. metabolit) přes střed membrány. Pozice minim (volné energie) nám říká, kde v membráně se léčivo nejpravděpodobněji vyskytuje. Naše studie chce také zjistit, jestli kanonické nebo isomerní struktury xenobiotik můžou ovlivnit získané výsledky. Xenobiotika pro naši studii jsme vybírali náhodně. Do studie jsme vybrali léčiva metabolizovaná šesti hlavními cytochromy P450: 3A4, 2D6, 2C9, 2C19, 1A2 a 2E1. Studie byla rozšířena o námelové alkaloidy³ s tím, že také námelové alkaloidy a jejich deriváty se používají jako léčiva (př. ergotamin). Využití počítačové simulace pro náš výzkum je velmi užitečné, protože v současnosti je obtížné experimentálně měřit partiční koeficienty velmi lipofilních molekul pomocí potenciometrické titrace⁴.

Membrána je předěl mezi dvěma prostředími o různém složení (nebo koncentraci). Membrána může propouštět různé látky skrz na základě jejich polariry, rozměrů nebo jejich lipofily. Už dlouhou dobu jsou pro studium membrán používány plazmatické membrány savčích erythrocytů (červených krvinek). Povrch plazmatické membrány je tvořen čtyřmi fosfolipidy: fosfatidylseriny, fosfatidylcholiny, fosfatidylethanolaminy a sfingomyeliny. Tyto fosfolipidy se vyskytují v membránách nejčastěji. Cholesterol, jako jeden ze zástupců lipidů, tvoří zbytek membrány, kdy jeho acylové řetězce tvoří střed membrány (nepolární oblast „nízké hustoty acylových řetězců“)⁵.

Naším úkolem je stanovit hodnotu pozice studovaných látek v membráně (vzdálenost od středu membrány), penetrační bariéry a log K (nebo taky partiční koeficient, který popisuje prostředí mezi hydrofilními hlavami membrány a vnějším vodným prostředím).

Lipidy jsou základní jednotkou biologických membrán⁶. Tyto lipidy mají hydrofilní „hlavu“ (head) a hydrofobní „ocas“ (tail, viz obrázek 2)⁷. Podle toho, čím je tvořena „hlava“ lipidu je můžeme rozdělit do tří skupin: fosfolipidy, sfingolipidy a cholesterol⁶. Pro naše studium jsme zvolili lipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DOPC),

který patří do skupiny fosfatidylcholinů neboli glycerolfosfolipidů⁸. Právě v takovéto membráně se nachází nejvíce léčiv metabolizovaných cytochromy P450⁹. Biologické membrány živočichů jsou tvořeny z velké části fosfatidylcholiny (PC)⁵, a proto byl zvolen právě tento lipid pro naši studii. U eukaryot tvoří fosfatidylcholin více než 50 % fosfolipidů obsažených v membráně¹⁰.



Obrázek 2 lipidová dvojvrstva neboli buněčná membrána (převzato z literatury)⁷

2. Teoretická část

2.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (zkráceně CYP450 či jen CYP) jsou metaloenzymy obsahující hem¹¹. Tyto metaloenzymy je možné najít v mnoha živých organismech od bakterií po lidi¹¹. Můžeme s velkou pravděpodobností předpokládat, že se CYP450 vyskytují ve všech organismech na světě. Způsob označení CYP450 si ukážeme na nejznámějším zástupci CYP3A4. Po zkratce CYP (cytochrom P450) následuje arabská číslice označující číslo rodiny. Toto číslo může ukazovat na funkci enzymu, ale může být také náhodně vybráno. Abychom mohli zařadit zvolený CYP450 do rodiny, tak by měl mít minimálně 40 % podobných sekvencí ve svých překrývajících se částech. Podrodina (subfamily) je značena velkým písmenem (např. A). Při podobnosti sekvencí větší než 55 % můžeme daný enzym zařadit do příslušné podrodiny. Jednotliví členové rodiny či podrodiny se od sebe musí lišit více než 3 % své sekvence. K označení jednotlivých enzymů v rodině či podrodině se opět používají arabské číslice¹². V naší studii jsme se zaměřili na 6 hlavních cytochromů a to: 3A4, 2D6, 2C9, 2C19, 1A2 a 2E1. Bližší popis uvedu v jednotlivých podkapitolách.

2.1.1 CYP3A4

Cytochrom P450 3A4 metabolizuje nejvíce léčiv z celé rodiny cytochromů P450¹³. Tento enzym je přítomen v trávicí soustavě, ledvinách a hlavně v játrech¹⁴. CYP3A4 je nejvíce se vyskytující enzym (ze skupiny CYP450) v játrech (při indukci je ho v játrech více než 60 %)^{1,15}. Protože se podílí na metabolismu většiny léčiv (substrátů) a struktury těchto metabolitů jsou známe, je možné provést srovnání léčivo-metabolit. Srovnáním léčivo-metabolit se myslí porovnání partičních koeficientů, penetračních bariér a pozic minim léčiv a jejich metabolitů.

Skupina látek metabolizovaná právě cytochromy P450 3A4 je dosti velká. CYP3A4 může vázat celou řadu substrátů (léčiv), protože je nejohlednějším cytochromem P450 z trojice studovaných hem-obsahujících metaloenzymů (CYP3A4, CYP2C9, CYP2A6)¹⁶.

2.1.2 CYP1A2

Dříve také známý jako 'P-448'. CYP1A2 je možné najít v krysích jaterních mikrozomech indukovaných methylchloranthrenem¹⁷. Tento enzym se nachází v játrech¹⁸. Substráty tohoto enzymu jsou aromatické aminy, polycyklické aromatické

uhlovodíky. Nejčastěji metabolizovaná léčiva CYP1A2 jsou acetaminofen, kofein, klozapin, fenacetin, takrin a theofilin. Enzym metabolizuje i substráty jiných CYP450 jako jsou fluvoxamin, imipramin, klomipramin, naproxen, ondansetron, propafenon, terbinafin, verapamil a (R)-warfarin¹. Hladina enzymu CYP1A2 může být zvýšena konzumací rostlin z řádu brukvotvarých, ale může být i snížena konzumací rostlin řádu miříkotvarých¹⁹. Tento enzym hraje také roli v chemické karcinogenezi. Substráty aktivované CYP1A2 jsou heterocyklické a aromatické aminy, některé sloučeniny nitroaromátů a aflatoxin B₁²⁰. CYP1A2 je geneticky polymorfni²¹ a hojně se vyskytuje u savců¹. Tento enzym patří nejen ke stabilnějším mezi CYP450, ale taky nedochází k jeho denaturaci^{22,23}.

2.1.3 CYP2D6

Enzym CYP2D6 je asi nejsledovanější (ze skupiny enzymů CYP450) lékaři a zdravotnickými specialisty¹. Tento enzym se nachází v játrech (2-4%) a menší množství v plicích (bronchiální sliznice a plicní parenchym)²⁴. Zjištění z testů, které probíhaly na Lékařské škole při nemocnici Svaté Marie v Londýně, zní takto: gen (produkující enzym CYP2D6) řídící alicyklickou hydrogenaci debrisoquinu kontroluje také aromatickou hydroxylaci guanoxanu a alifatickou hydroxylaci fenacetinu²⁵. Mezi látky metabolizované enzymem CYP2D6 patří propafenon, spartein, debrisoquin a dextromethorfan. Hlavní substráty tohoto enzymu jsou blokátory β -adrenoreceptorů a tricyklická antidepresiva¹. Různost aktivit ve vzorcích lidských jater může být připsána genetickému polymorfizmu, protože CYP2D6 není indukován¹. Pokud chceme studovat interakci CYP2D6 se substráty, potom můžeme použít připravenou krystalovou strukturu²⁶.

2.1.4 CYP2C

CYP2C je podrodina, kterou tvoří enzymy CYP2C8, 2C9, 2C10 a 2C19. Nejzajímavější enzymy z této skupiny jsou CYP2C9 a CYP2C19. Tyto enzymy metabolizují hojně používaná léčiva. Polymorfizmus těchto dvou enzymů je dobře známý. Enzymy 2C9 a 2C10 mají velmi podobnou strukturu, substrátovou specifitu a vyskytují se společně¹⁸. Pro CYP2C9 jsou typické 4'-hydroxylace tolbutamidu a 7'-hydroxylace-(S)-warfarinu. Naneštěstí se i CYP2C19 podílí na metabolismu tolbutamidu²⁷. Pro enzym CYP2C9 jsou typickými substráty nesteroidní, protizánětlivé léky a hypoglykemika (někdy také známé jako antidiabetika)¹. Studium CYP2C9 a jeho schopnosti metabolizovat hypoglykemika nám umožňuje zjistit, jestli byla tato léčiva z organismu odbourána.

Pokud se hypoglykemika z organismu nevyloučí dostatečně rychle, potom hrozí vážná hypoglykémie. Podobný případ může nastat u (S)-warfarinu, kdy nedostatečná znalost jeho odbourávání z organismu může způsobit krvácení²⁸.

Enzym CYP2C19 je značně polymorfní. Zhruba u 20 % obyvatel Asie je snižená jeho schopnost metabolizovat substráty. Příkladem, kdy je substrát metabolizován několika CYP450 je omeprazol. Omeprazol je typickým substrátem CYP2C19, ale je metabolizován i CYP3A4. U osob s nižší schopností metabolizovat substráty CYP2C19 je hodnota AUC (Area Under Curve) 12 krát vyšší, než u osob s vysokou schopností metabolizovat tyto substráty²⁹.

2.1.5 CYP2E1

Tento enzym je přítomen v tělech savců³⁰. Enzym 2E1 se vyskytuje v játrech (7 %) ¹³. Znáмым se stal tento enzym díky své roli v metabolismu etanolu³⁰. 2E1 se nepodílí pouze na přeměně etanolu a acetonu, ale také na biotransformaci malých molekul (např. halogenderivátů). Mezi malé molekuly, které metabolizuje CYP2E1 řadíme: 1,1,1-trichloreten, 1,2-dichlorpropan, tetrachlormetan (chlorid uhličitý), chloroform, 1,2-dibrometen, 1,2-dichloreten, chlormetan, dichlormetan, vinylchlorid, acetaldehyd, benzen a styren. Většina z výše zmíněných molekul patří do skupiny látek hepatotoxických^{17,31,32}. Enzym 2E1 metabolizuje mimo jiné i těkavá anestetika jako jsou halotan, enfluran, isofluran a sevofluran. Selektivními sondami pro testy jeho aktivity in vivo jsou paracetamol, fenacetin a chlorzoxazon³³. Nitrosaminy a paracetamol jsou metabolizovány CYP2E1 (s přispěním CYP3A4) na reaktivní N-acetyl-4-benzochinon imin^{32,34}. Enzym 2E1 se podílí na aktivaci mnoha karcinogenů, prokarcinogenů a toxických látek¹. Snižování aktivity tohoto enzymu může být způsobeno konzumací česneku (konkrétně látky v něm obsažené-diallylsulfidu), cibule (opět diallylsulfid) nebo brukvovitých rostlin (např. zelí, kapusta)³⁵.

2.2 Buněčné membrány

Jakýkoliv příjem potravy, léčiv nebo doplňků stravy musí projít trávicím traktem. Potom, co je potrava rozložena na jednoduché molekuly (např. kyselina jablečná, glukóza), může projít přes buněčnou membránu. Tyto orgány jsou nedílnou součástí našich organismů. Mohou od sebe oddělovat dvě prostředí o rozdílné polaritě, hustotě iontů a funkci^{5,36}. Základními stavebními kameny buněčných membrán jsou proteiny a lipidy³⁷. Lipidy uspořádané hydrofobními konci k sobě a hydrofilními „hlavami“ od

sebe tvoří lipidovou dvojvrstvou³⁸ (viz obrázek 2)⁷. Oblast hydrofilních hlav se nachází v rozmezí 1,5 až 2,5 nm od středu membrány³⁹. Na obrázku můžeme vidět tekutý mozaikový model buněčné membrány, který se v současnosti používá pro její popis⁷. Vlastnosti membrán ovlivňují lipidy, z kterých se jednotlivé membrány skládají. Jinak se chovají membrány mezi různými organelami, ale jiné vlastnosti má i vnitřní a vnější strana téže membrány³⁸.

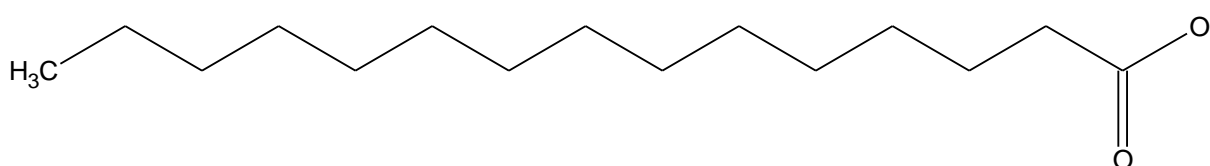
2.2.1 Lipidy a jejich kategorie

Lipidy se běžně vyskytují v tucích, voscích, sterolech, glyceridech a mnoha dalších látkách, s kterými se dennodenně setkáváme^{40,41}. A právě z lipidů a proteinů se skládají buněčné membrány³⁷. Pro tvorbu buněčných membrán jsou velmi často používány glykofosfolipidy (fosfolipidy)⁴¹. Lipidy však mají také funkci úložiště energie⁴¹ a rozpoznávání signálů v organismu³⁸. Definice lipidů: malé hydrofobní molekuly, které tvoří ve vodném prostředí vezikuly nebo jednovrstevné či vícevrstevné liposomy. Liposomy jsou vezikuly s vodou uprostřed a tyto liposomy jsou obklopené fosfolipidovou membránou³⁶.

Dohromady máme 8 kategorií lipidů: mastné kyseliny, glycerolipidy, glykofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy⁴¹. Nyní si trochu přiblížíme jejich využití a vlastnosti:

2.2.1.1 Mastné kyseliny

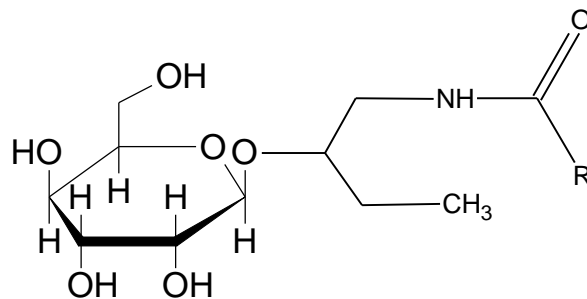
Mastné kyseliny slouží jako zásobní zdroj energie. Ve studii z roku 2003 byla postulována možnost mastných kyselin „pohánět“ (zásobovat) mozkové buňky hlodavců energií⁴². Jakmile bio transformujeme mastné kyseliny, tak získáme velké množství ATP. Mastné kyseliny jsou nejlepšími zdroji energie pro srdce a kosterní svalstvo^{42,43}. Tvořeny jsou karboxylovou kyselinou (hlava) a alifatickým řetězcem („ocas“), který může být nasycený (viz obrázek 3) nebo nenasycený.



Obrázek 3 znázorňuje molekulu mastné kyseliny pomocí strukturního vzorce, karboxylová funkční skupina (COO⁻) tvoří hlavičku a zbytek molekuly tvoří alifatický řetězec („ocas“).

2.2.1.2 Glycerolipidy

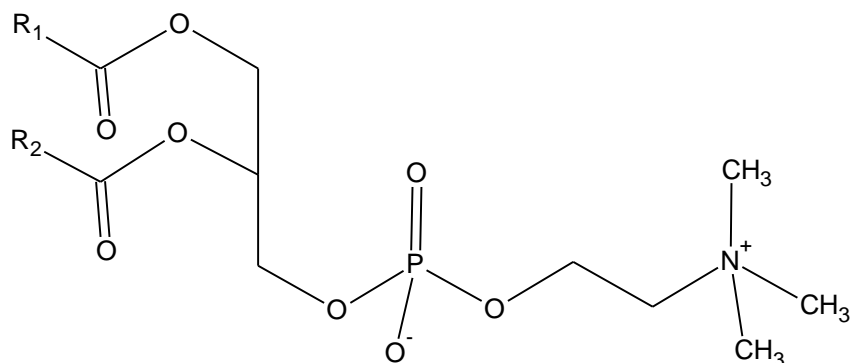
Glycerolipidy jsou tvořeny esterifikací glycerolu různými mastnými kyselinami⁴⁴. Nejznámějším příkladem je triacylglycerol (triglycerid). Glycerolipidy slouží jako zásobárna velkého množství energie ve formě tuku, který se nachází ve zvířecích tkáních. Hydrolýzou triglyceridů v adipózní tkáni získáme opět glycerol a mastné kyseliny. Toto je první krok v metabolismu tuků⁴⁵. Jiným příkladem glycerolipidů je glykosylglycerol (viz obrázek 4), který vzniká připojením cukerné jednotky (např. glukóza nebo galaktóza) přes glykosidovou vazbu na glycerol vázící mastnou kyselinu⁴⁴. Příkladem takovýchto struktur jsou digalaktosyldiacylglyceroly rostlinných membrán⁴⁶.



Obrázek 4 glykosylglycerolu (konkrétně 2-(β-glykosyl)acylglycerolu)

2.2.1.3 Glycerofosfolipidy (fosfolipidy)

Glycerofosfolipidy jsou základem buněčných membrán a hrají i významnou roli v buněčné signalizaci⁴⁷. Fosfolipidy jsou tvořeny glycerolem a fosfátovou skupinou (polární hlava). Hydrofobní „ocas“ je tvořen dvěma acylovými řetězci. Jednotlivé acylové řetězce tvoří mastné kyseliny (např. palmitová, myristová, olejová, stearová)³⁸. Poté, co se na fosfát naváže další polární skupina, vznikne glycerofosfolipid mající určitý náboj (př. cholin, etanolamin, serin)³⁸ (viz obrázek 5). Glycerofosfolipidy mohou být na základě povahy polární skupiny vázané v poloze *sn-3* na glycerolu (eukaryota) a poloze *sn-1* na glycerolu (archebakterie)⁴⁸. Fosfolipidy se hojně vyskytují v nervových tkáních. Odchylky v jejich uspořádání stojí za množstvím nervových poruch⁴⁸.



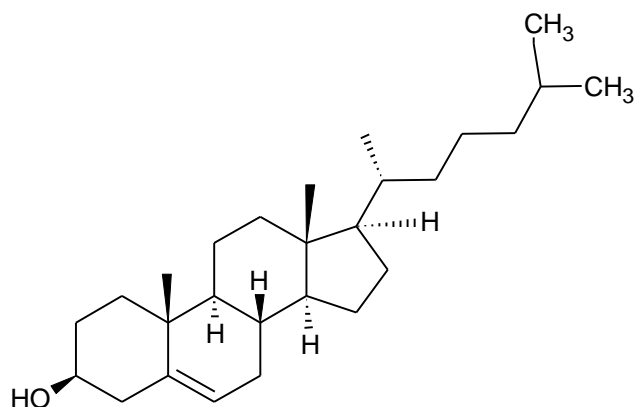
Obrázek 5 fosfatidylcholinu. Cholin („hlava“) vážící se na glycerol přes fosfát, R_1 a R_2 představují dva acylové řetězce mastných kyselin („ocas“).

2.2.1.4 Sfingolipidy

Sfingolipidy mají za základ sfingoidní alkohol⁴⁹ (podobně jako mají glycerolipidy glycerol), který je syntetizován *de novo* ze serinu a CoA (koenzymu A). Ceramid vznikne po napojení acylové části na sfingosin přes amidovou vazbu³⁸. Sfingolipidy se vyskytují v přírodě jako sfingomyeliny (u savců, membrány)⁵⁰, fosfatidylethanolaminy ceramidu (u hmyzu)⁵¹ a inositolu fosforylceramidu (u hub)⁵².

2.2.1.5 Steroly

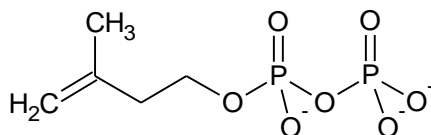
Nejznámějším zástupcem sterolů je cholesterol (viz obrázek 6)⁵³. Steroly jsou významnou součástí buněčných membrán (lipidových dvojvrstev)³⁷. Základní stavební jednotkou sterolů je struktura tvořená čtyřmi cyklickými uhlovodíky (třemi šestičlennými a jedním pětičlenným, viz obrázek 6). Steroly plní celou řadu funkcí a to jako hormony (př. testosteron, estrogen), řízení a koordinaci buněčné aktivity. Žaludeční kyseliny vznikají oxidací cholesterolu v jaterních buňkách. Neméně významné jsou i glukokortikoidy sloužící k potlačení imunitní reakce organismu. Příkladem takového léčiva je dexamethason⁵⁴.



Obrázek 6 cholesterolu. Ve spodní části je vidět základní jednotka sterolů tvořena čtyřmi cyklickými uhlovodíky.

2.2.1.6 Prenoly

Prenoly jsou syntetizovány z isopentenyl difosfátu (viz obrázek 7) a dimethylallyl difosfátu⁵⁵. Základní stavební jednotkou prenelů je 3-Methyl-2-buten-1-ol (neboli prenil). Isopentenyl difosfát je výchozí látkou pro přípravu terpenů, ubichinonu, chlorofylu, karotenoidů (prekurzory vitamínu A) a vitamínu K⁵⁶. Karotenoidy patří mezi významné antioxidanty⁵⁷. Mezi terpeny patří například myrcen (bobkový list), limonen (citronová silice)⁵⁸.



Obrázek 7 isopentenyl difosfátu. Tato molekula je tvořena isoprenem (základní jednotka terpenů) a difosfátem (P_2O_7)³⁻.

2.2.1.7 Sacharolipidy

Jako sacharolipidy označujeme látky, v nichž jsou mastné kyseliny přímo spojeny s cukrem (např. glukózou, galaktózou). Tyto lipidy se mohou stát součástí buněčných membrán. Monosacharidy substituují glycerol v glykolipidech a glycerofosfolipidech³⁶. Nejznámějším sacharolipidem je acylovaný glukosamin (slouží k přípravě lipidu A)⁵⁹.

Lipid A je endotoxin zodpovědný za toxicitu Gram-negativních bakterií. Právě jeho toxicita hraje důležitou roli při spouštění včasné imunitní reakce organismu proti Gram-negativním bakteriím^{59,60}.

2.2.1.8 Polyketidy

Polyketidy jsou látky přítomné ve všech živých organismech. Právě proto se některé z nich využívají jako léčiva (např. Erytromycin, Tetracyklin, Ivermektin)⁶¹. Syntetázy mastných kyselin katalyzují opakovanou kondenzaci esterů acetyl-CoA (acetylkoenzymu A), aby vytvořily lineární polyketidový řetězec⁶¹.

2.3 Farmakokinetika

Farmakokinetika se zabývá stupněm a rozsahem transportu léčiv do tkání. Nejedná se pouze o studium vstupu léčiva do těla (absorpci), ale i o jeho eliminaci. Abychom mohli léčivo (xenobiotikum) úspěšně dopravit do místa jeho účinku je nezbytné znát schopnost jeho absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace (ADME)⁶². Samozřejmě nestačí léčivo jen dopravit do místa účinku, ale musí mít i správnou koncentraci pro zvolený interval podávání (administraci) účinné látky. Vhodný poměr mezi absorpcí léčiva a jeho eliminací z organismu je klíčový pro určení podávaného množství tohoto léku. Mohou nastat dva extrémy. První extrém nastává, když je léčivou rychleji odbouráváno z organismu. V takovémto případě je léčba nedostatečná. Druhý extrém nastává, když se léčivo z organismu neodbourává dostatečně rychle (zvyšuje se jeho koncentrace). Následkem druhého extrému může dojít i k trvalému poškození některých orgánů (př. jater)^{38,62}.

2.4 ADME podávaných xenobiotik

2.4.1 Absorpce

V případě všech výše zmíněných způsobů podávání xenobiotik (mimo intravenózní a infuzní podávání léčiv) jsou účinné látky absorbovány do organismu vlasečnicemi (velmi tenkými cévami). Absorpce xenobiotik je ovlivněna množstvím tuku ve tkáních (u pokožky) a hustotou prokrvení tkáně vlasečnicemi. Dalšími faktory ovlivňující absorpci jsou různé enzymy, trávicí šťávy, interakce s jídlem, rozdílné hodnoty pH, odlišné permeability a různé velikosti částic⁶².

2.4.1.1 Vazba léčiv na proteiny v plazmě

Na základě lipofility a ionizační schopnosti se léčiva váží na proteiny obsažené v plazmě. S rostoucí lipofilitou roste síla vazby mezi xenobiotikem a proteinem. Konstanta afinity (rovnováhy) mezi proteinem, léčivem a komplexem léčivo-protein:

$$K_A = \frac{C(b)}{C(u) * [P] * n}, \quad (1)$$

kde $C(b)$ je koncentrace léčiva vázaného v komplexu, $C(u)$ je koncentrace samotného léčiva, $[P]$ je koncentrace proteinu a n je počet vazebných míst na 1 mol zvoleného proteinu⁶².

Faktem, který je nutno zohlednit, je nemožnost renálně eliminovat léčivo vázané v komplexu z těla.

Absorpci léčiv ovlivňuje i poměr koncentrací léčiva mezi plazmou a krví R ⁶³, kde vazebné místo léčiva na erytrocytech má podobné složení jako protein v plazmě:

$$R = \frac{C(e) * H + C(p) * (1 - H)}{C(p)}, \quad (2)$$

kde $C(e)$ je koncentrace ¹⁴C značených léčiv v erytrocytech, $C(p)$ je koncentrace léčiv v plazmě a H je relativní objem krve obsahující erytrocyty i plazmu^{63,64}.

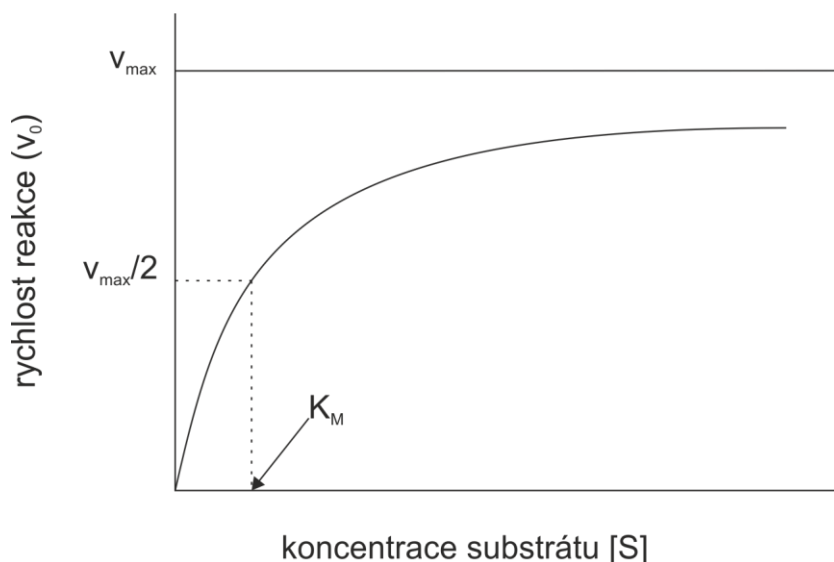
Léčiva vázaná v plazmě mají rychlejší přesun (do místa účinku) než léčiva vázaná na erytrocytech. Proto je velmi důležité znát poměr mezi koncentrací léčiva vázaného v plazmě a koncentrací léčiva vázaného na erytrocytech⁶².

2.4.2 Distribuce, eliminace

Játra jsou orgánem eliminujícím nejvíce cizorodých látek. U malých molekul léčiv je nejprve metabolismem jater zvýšena jejich hydrofilita, a následně jsou odstraněny z těla ven vylučovací soustavou. Pouze 3 rodiny CYP450 a 12 enzymů se podílí na odbourávání léčiv z organismu. Rychlost biotransformační reakce řízené enzymem v je závislá na koncentraci léčiva podle vztahu Michaelise a Mentenové:

$$v = CL_{int} * C = \frac{v(max) * C}{K(M) + C}, \quad (3)$$

kde CL_{int} je intrinsické odstranění léčiva závislé pouze na intrinsickém chemickém složení léčiva, $v(max)$ je maximální rychlost průběhu reakce, C je koncentrace léčiva, K_M je Michaelisova konstanta⁶².



Obrázek 8 enzymem katalyzované reakce. Znázorňuje takřka lineární závislost rychlosti reakce na koncentraci léčiva (substrátu). CL_{int} je rovno poměru $v(max):K_M$ ⁶².

Pouze malé množství léčiva, které není vázáno proteiny v plazmě, je ponecháno pro distribuci do tkání. Absorpce, distribuce a eliminace (ADE) jsou závislé na lipofilitě, kyselém/neutrálním/zásaditým charakteru a chemické struktúře léčiv. Dalšími faktory, na kterých jsou ADE závislé, jsou krevní tok, velikost orgánů, transportní cesty a afinita k nosičům⁶². Distribuce závisí na průchodu léčiva přes buněčnou membránu (lipidovou dvojvrstvu)³⁹.

2.4.2.1 Pasivní průchod přes buněčnou membránu

Základem tohoto děje je první Fickův zákon difúze (4), kde látka difunduje v takovém směru, aby vyrušila koncentrační gradient. Rychlost difúze látky odpovídá velikosti koncentračního gradientu. Koeficient permeability P , který reprezentuje úměrnost rychlosti difúze látky k velikosti koncentračního gradientu, je vypočítán ze vztahu:

$$P = \frac{J}{A\Delta C}, \quad (4)$$

kde J je tok roztoku, ΔC je koncentrační gradient podél rozhraní, A je plocha rozhraní⁶⁵.

2.4.2.2 Průchod přes buněčnou membránu v programu COSMOmic

Přístup programu COSMOmic² vychází z COSMO-RS metody⁶⁶. Tato metoda umožňuje přesnější předpověď distribuce molekul, které jsou součástí buněčných membrán nebo micelárních struktur. Při provádění kvantově-chemických výpočtů se používá teorie funkcionálu hustoty (DFT). Kvantově-chemické výpočty polarizace povrchu a hustoty náboje ρ jsou využity ve statistické termodynamice metody

COSMO-RS. Výpočty funkcionálu hustoty musí být provedeny pro každou skupinu molekul v systému zvlášť (lipidy, voda, molekuly léčiv)³⁹.

2.5 Použité programy a metody

Softwarové vybavení použité při vypracovávání diplomové práce. Programy: COSMOmic, COSMOthermX⁶⁷, ChemSketch⁵³

Postup při použití COSMO:

1) V databázi drugbank.ca⁶⁸⁻⁷¹ jsme našli látku-substrát (resp. metabolit) CYP450. Zkontrolovali jsme její strukturu pomocí databází pubchem⁷² a chemspider.com⁷³. Pomocí databáze drugbank.ca⁶⁸⁻⁷¹ jsme zjistili, které cytochromy P450 metabolizují jednotlivá léčiva a ověřili jsme získané informace pomocí SuperCYP⁷⁴.

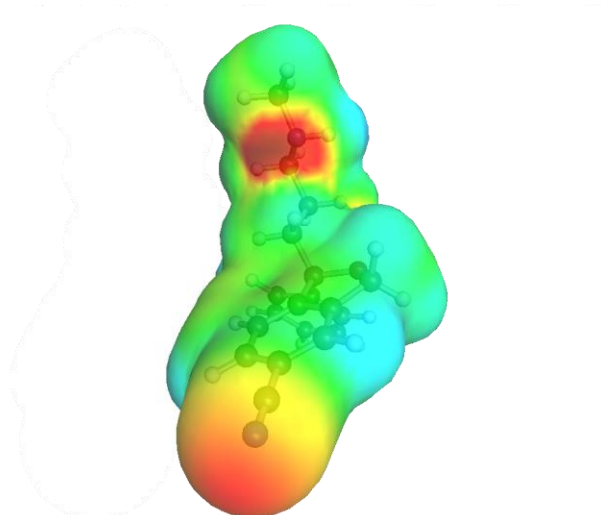
2) SMILES (simplified molecular-input line-entry system) zkontrolované molekuly jsou využity k vygenerování strukturního vzorce a následně je 3D struktura optimalizována modelem COSMO za použití metody DFT-COSMO a báze TZVP.

3) Po optimalizaci jsou prostřednictvím COSMOtherm⁶⁷ vypočítány termodynamické vlastnosti studované molekuly.

4) Z výsledků získáme hodnoty partičního koeficientu, volné energie membrána/voda, penetrační bariéry, polohu minima a σ -profil.

2.5.1 COSMO

Model COSMO (Conductor-like Screening Model) je založen na kombinaci kvantově-chemického popisu molekuly s kontinuálním popisem okolního rozpouštědla⁷⁵ a slouží jako základ programu COSMOtherm. Model COSMO nejprve provede kvantově-chemický COSMO výpočet vložené struktury molekuly (př. N-desmethylocitalopramu). Z tohoto výpočtu získáme COSMO soubor obsahující hodnoty energie a distribuci hustoty elektrostatického potenciálu na povrchu molekuly⁷⁵. Příklad grafického výstupu modelu COSMO je obrázek 9.



Obrázek 9 molekuly N-desmethylcitalopramu, kde červená barva značí oblast negativního elektrostatického potenciálu, zelená barva oblast nulového a modrá barva oblast pozitivního elektrostatického potenciálu na povrchu molekuly.

Program COSMO vytvoří okolo molekuly kavitu podle atomových poloměrů jednotlivých prvků. Takto vytvořená molekula solvatuje za tvorby elektrostatického potenciálu na svém povrchu. Uvnitř perfektního vodiče je podle specifických pravidel a rozměrů jednotlivých atomů vytvořena okolo molekuly kavita. Dipól molekuly spolu s vyššími momenty okolního média vykreslí na povrchu molekuly kavitu, aby vyrušily elektrické pole uvnitř vodiče a elektrické pole tangenciální k povrchu. Vzorec (5) pro výpočet indukovaných změn na povrchu v diskrétním prostoru⁷⁶:

$$\Phi_{\text{celk}} = 0 = \Phi_{\text{sol}} + Aq^*, \quad (5)$$

kde Φ_{celk} je celkový potenciál kavity povrchu, Φ_{sol} je potenciál distribuce náboje molekuly rozpouštědla, q^* je elektrostatický potenciál na povrchu vodiče, A je funkcí geometrie kavity a popisuje potenciál interakce mezi náboji na površích molekul.

Velkou výhodou modelu COSMO je zjednodušení řešení hraničních podmínek dielektrika stíněného náboje (screening charge) tím, že stínící náboj dielektrika o propustnosti ϵ přiblíží hodnotě zmenšeného stíněného náboje vodiče⁶⁶. Tato metoda je dostatečně robustní díky nižší elektronové hustotě roztoku. Elektronová hustota roztoku přesahující kavitu se označuje jako odlehlý náboj (outlying charge). Operátory podmínek hranic dielektrika zajišťují robustnost tohoto modelu. Nesporným přínosem modelu COSMO je nulová chyba odlehlého náboje. Jiné modely kontinuální solvatace dielektrik mají i 20% chybu odlehlého náboje. Model COSMO poskytuje dostatečně

přesné výsledky pro neutrální molekuly^{75,77}. Pokud do vzorce (6) pro výpočet faktoru škálování $f(\varepsilon)$ dosadíme za x ($x = 0,5$), potom dostaneme nejpřesnější výsledky pro neutrální molekuly⁷⁵:

$$f(\varepsilon) = \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + x}, \quad (6)$$

kde ε je propustnost stínícího náboje dielektrika (permeabilita dielektrika), x je proměnná, která při hodnotě 0,5 poskytuje kompromis mezi optimálními hodnotami náboje iontu a dipólem vloženým do sférické kavity⁷⁵.

Výsledky modelu COSMO (při $x = 0,5$) mají chybu do 0,5 %, pokud se permeabilita dielektrika limitně blíží nekonečnu. Toto platí pro silná dielektrika jako je voda ($\varepsilon=80$)⁶⁶. Model COSMO poskytuje výsledky s přesností do 10 %, i když je permeabilita dielektrika velmi nízká ($\varepsilon = 2$). Toto tvrzení ovšem neplatí pro ionty⁷⁷.

2.5.2 COSMOtherm

COSMOtherm je program sloužící k výpočtu termo fyzikálních vlastností tekutin. Základem tohoto programu je COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents)^{66,67}. COSMO-RS vzniklo, protože model COSMO nedokázal rozlišit dvě rozpouštědla s úplně identickými dielektrickými konstantami^{66,77}. Pro model COSMO-RS je nejdůležitějším deskriptorem hodnota lokální hustoty náboje σ , která může vzniknout na povrchu molekuly, pokud bude molekula umístěna ve virtuálním vodiči⁶⁶. Deskriptor σ velmi dobře popisuje lokální polaritu povrchu molekuly. COSMO-RS je více než obyčejný model kontinuálního solvatačního modelu, protože v sobě integruje koncepty kvantové chemie, kontinuálních modelů dielektrik, interakcí elektrostatických potenciálů a statistické termodynamiky. Přes všechny tyto koncepty vychází COSMO-RS stále z výsledků modelu COSMO. Výpočty modelu COSMO poskytují diskrétní oblast okolo molekuly, která je zanořena ve virtuálním vodiči⁷⁵. Každá diskrétní oblast okolo molekuly je ovlivňována svým okolím a také zpětnou polarizací studované molekuly. Navíc získáme celkovou energii molekuly s ideálním elektrostatickým potenciálem E_{COSMO} ⁷⁸. Právě tento přístup překonává mnohá omezení a teoretické nedostatky dřívějších kontinuálních modelů dielektrik⁷⁷. Podle teorie COSMO-RS je kapalina soubor těsně sbalených molekul s ideálním elektrostatickým potenciálem. Abychom mohli dosáhnout takto těsného sbalení, potom musíme stlačit systém a kavity jednotlivých molekul se lehce zdeformují (objem jednotlivých kavit se

téměř nezmění)⁷⁹. Jednotlivé molekuly jsou stále uvnitř vodiče a interagují jejich elektrostatické potenciály. Skutečnost je ale taková, že molekuly nejsou obaleny vodičem. V tomto výpočtu není zohledněna polarita skutečného rozpouštědla⁷⁷. Výpočet takovéto „zmetkové (misfit)“ energie E_{MF} vychází ze vzorce (7)⁷⁹:

$$E_{MF}(\sigma, \sigma') = a_{eff} \frac{\alpha}{2} (\sigma + \sigma')^2, \quad (7)$$

kde a_{eff} je účinná (efektivní) oblast styku dvou povrchů, α je nastavitelný parametr, σ je elektrostatický potenciál povrchu první molekuly, σ' je elektrostatický potenciál povrchu druhé molekuly.

Nejdůležitějším prvkem modelu COSMO-RS je hodnocení σ -profilů. σ -profily ukazují hustotu náboje na povrchu studovaných molekul⁸⁰. Díky své schopnosti zacházet s různými druhy směsí za různých teplot je COSMO-RS velmi populární v chemickém inženýrství a v širokých oblastech fyzikální a medicínské chemie⁷⁸.

COSMO-RS je metoda nevyužívající velkých množství experimentálních dat v porovnání s GCMs (group contribution methods-skupina metod přispívajících k interpolaci struktury látky). Tato metoda přináší potřebné informace o molekulárních interakcích v roztoku pomocí kvantově-chemických výpočtů chemických látek zkombinovaných s rigidním fyzikálním popisem molekul v roztoku⁸¹. Podle přesnosti výsledků uvedených v podkapitole 2.5.1 může být COSMO-RS v současnosti považováno za nejpřesnější model předpovídání solvatačních energií.

2.5.3 COSMOmic

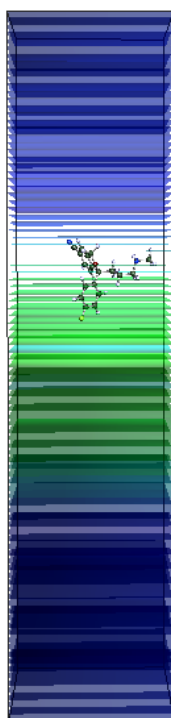
Program COSMOmic byl vytvořen jako řešení velkých výpočetních nároků na získávání profilů volných energií prostřednictvím molekulové dynamiky. Kontinuální solvatační modely založené na kvantově-chemických kalkulacích jsou levnější a také dostatečně spolehlivou variantou pro výpočty termodynamických vlastností látek (partiční koeficienty, úrovně energetických bariér glycerolfosfolipidů)^{2,39}. COSMOmic neobsahuje nastavitelné parametry. Umožňuje předpověď distribuce molekul v micelárních systémech a lipidových dvojvrstvách².

Znalosti o distribuci molekul v membránách jsou středem zájmu návrhu léčiv a enviromentálních věd. Molekuly prochází přes membránu (např. stěna střeva nebo pokožka) do místa svého účinku na základě lipofility, polarity, náboje a rozměrů. Dalším faktorem ovlivňující průchod molekul přes membránu je i složení membrány

samotné². Existuje opravdu velké množství různých druhů membrán. Pro představu uvedu jen zlomek používaných druhů membrán: DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin), DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfocholin), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfocholin), DPPE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin). Výpočetní chemie aproximuje partiční koeficienty buněčných membrán pro návrh léčiv a environmentální vědy partičním koeficientem oktanol-voda. Prvním důvodem, proč je partiční koeficient oktanol-voda používán v tak hojné míře, je velké množství experimentálních dat, která jsou snadno dostupná. Druhým důvodem, proč je partiční koeficient takto hojně využíván, je jeho dobrá korelace s partičním koeficientem membrána-voda².

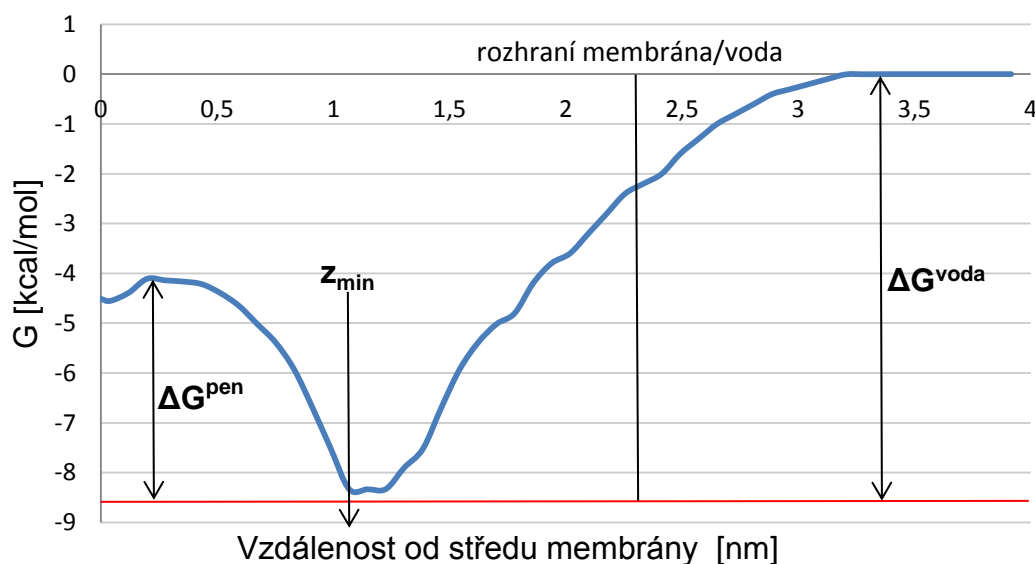
Více než polovina léčiv má kyselou nebo zásaditou část, a proto je důležité studium průchodu nabitých částic přes membránu.

Model označovaný jako COSMOmic (COSMO-RS pro micely) je rozšířením COSMO-RS. Tento přístup je založen na kvantově-chemických výpočtech a nezávislém párování interagujících povrchů podle algoritmu statistické termodynamiky. COSMOmic je využíván pro hodnocení, jak moc jsou jednotlivé molekuly rozdělovány mezi vodou a biologickými membránami. Čím jsou σ -profily dvou fází komplementárnější, tím jsou tyto dvě fáze mísitelnější³⁹. Mechanický model detailně popisuje anizotropní systém membrány². Metoda COSMOmic analyzuje strukturu membrány ve vodném prostředí a odhaduje hodnoty volné energie molekuly kolmé na povrch membrány³⁹. Výpočet v programu COSMOmic je založen na analýze geometrií, rotačních stavů a σ -profilů rozpuštěných molekul a membrány². V této práci jsme se zaměřili na studium interakcí xenobiotik s lipidovou membránou. Membrány jsou nejdůležitější a nejlépe studované samoskladebné micelární struktury. V naší studii používáme membránu DOPC se symetrií planární/lamelární. Program COSMOmic rozdělí membránu na padesát vrstev, kde vrstvy se stejnou barvou mají stejnou teplotu (viz obrázek 10). Studovaná látka (substrát nebo metabolit) v každé vrstvě vyzkouší 162 orientací, než projde do další vrstvy. Nejvýhodnější je orientace s nejnižší hodnotou volné energie. Z grafu (viz graf 1) závislosti volné energie na vzdálenosti od středu membrány vypočítáme hodnotu partičního koeficientu (viz vzorec 8 v experimentální části). COSMOmic lze stejně dobře použít na další micelární systémy složené jak z iontových, tak neiontových povrchově aktivních látek².



Obrázek 10 membrány rozdělené na padesát vrstev. Hydrofilní vrstvy jsou modré a lipofilní vrstvy jsou zelené. V membráně je molekula N-desmethylcitalopramu.

Graf volné energie



Graf 1 volné energie obecné molekuly znázorňuje penetrační bariéru ΔG^{pen} , kterou musí molekula překonat, aby se dostala do středu membrány (0 nm). Dále je v grafu vyznačena oblast minima z_{min} , kde se studovaná molekula bude nejpravděpodobněji nacházet a ΔG^{voda} , která udává volnou energii přenosu molekuly z vodného prostředí do membrány.

3. Experimentální část

Úkolem Teoretického studia interakcí xenobiotik s membránami, jak už název napovídá, je srovnání hodnot partičních koeficientů a poloh minim (oblast, kde se molekula bude nacházet s nejvyšší pravděpodobností) substrátů a metabolitů. V této práci jsme studované molekuly rozdělili do skupin podle toho, který cytochrom je metabolizuje nebo kterého cytochromu jsou metabolitem. Aby bylo možné nějak smysluplně zhodnotit získané výsledky takto rozmanité a rozsáhle skupiny látek, tak byly látky rozděleny do skupin podle svého substrátu (látka metabolizovaná na jednotlivé metabolity). Toto členění se jeví jako nejrozumnější, protože takto vzniklo jen 30 skupin látek, které můžeme hodnotit podle jednotlivých substituentů nebo změn (v jejich struktuře) od struktury substrátu. Rozlišujeme, zda se jedná o substrát nebo metabolit a v souvislosti s tím, který cytochrom je bude metabolizovat (popř. je metabolizoval). Jak už bylo popsáno v teoretické části, tak jsme se zaměřili na šest hlavních cytochromů: 3A4, 2D6, 2C9, 2C19, 1A2 a 2E1. Cílem této práce je stanovit partiční koeficient, protože různá měření udávají rozdílné hodnoty a program COSMO nám nabízí mocný nástroj pro jejich rychlé a současně přesné stanovení. Význam této práce tkví v stanovení, jak moc bude látka zadržována v organismu. Pokud by látka byla zadržována hodně, potom může dojít k předávkování, zatímco pokud málo, tak léčba nebude účinná.

3.1 Přehled studovaných systémů

V této práci bylo studováno celkem 474 látek. Cytochromem P450 nejvíce metabolizující látky je 3A4. Tento cytochrom metabolizuje něco málo přes 39 % všech studovaných látek metabolizovaných některým z šesti hlavních cytochromů. V pořadí druhým neaktivnějším cytochromem je 2D6 s 15 %. Následují cytochromy: 2E1 (5,7 %), 1A2 (5,3 %), 2C9 (4,5 %) a 2C19 (3,3 %). Počet studovaných metabolitů byl nižší než počet studovaných substrátů, protože u některých metabolitů není známa jejich metabolická cesta a ani jejich struktura. Nejvíce metabolitů, z námi sledované skupiny, náleží 3A4 (23,6 %), následně 2C9 (8,8 %). Zastoupení zbývajících metabolitů: 1A2 (7,4 %), 2C19 (4,9 %), 2D6 (6,4 %) a 2E1 (2,4 %).

3.2 Výpočet partičního koeficientu

Partiční koeficient nám slouží k popisu průchodu zvolené látky přes membránu. Partiční koeficient nám udává poměr koncentrací studované látky ve dvou prostředích

membrána/voda. Pro jeho výpočet je potřeba znát hodnotu volné energie v minimu (oblasti, kde se molekula bude vyskytovat nejčastěji v membráně) a teplotu, při které molekula procházela přes membránu. Pro výpočet partičního koeficientu jsem použil vzorec³⁹ (8):

$$K = 2 \int_{voda}^0 e^{\frac{-\Delta G(z)}{RT}} dz, \quad (8)$$

kde $\Delta G(z)$ je hodnota volné energie v J/mol, R je univerzální plynová konstanta (její hodnota je $8,31446 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), T je termodynamická teplota v K (310 K). Celý výraz před integrálem násobíme dvěma, protože membrána má dvě zrcadlově stejné části, kde každá část je integrována od vnějšího prostředí (vody) po střed membrány (hodnota nula). Ze vzorce (8) jasně vyplývá, že partiční koeficient je bezrozměrné číslo. Pro snadnější srovnání budeme dále používat pouze dekadický logaritmus partičního koeficientu ($\log K$), který budeme dále v práci označovat za partiční koeficient.

3.3 Srovnání partičních koeficientů

Abychom mohli srovnat partiční koeficienty jednotlivých látek, tak si je rozdělíme do skupin podle substrátu. S použitím vzorce (9) určíme $\Delta \log K$, které nám poslouží i k porovnání membránových afinit substrátu a příslušného metabolitu:

$$\log K_{met} - \log K_{subst} = \Delta \log K, \quad (9)$$

kde $\log K_{met}$ je partiční koeficient metabolitu a $\log K_{subst}$ je partiční koeficient substrátu. Předpokládáme, že partiční koeficient metabolitu by měl být nižší než partiční koeficient substrátu. Léčiva metabolizovaná cytochromy P450 jsou lipofilnější než jejich metabolity, protože hydrofilnější látky se lépe rozpouštějí ve vodě a snadněji se vylučují z organismu. Nejpočetnější skupina studovaných metabolitů má hydroxylovou funkční skupinu. Tato skupina zvyšuje hydrofilitu metabolitů. Hydrofilnější metabolity se více rozpouštějí ve vodě než v membráně, a proto mají podle vzorce (10) nižší partiční koeficient. Pokud je rozdíl partičních koeficientů ($\Delta \log K$) podle vzorce (9) záporný, potom má metabolit nižší afinitu k membráně než substrát a náš předpoklad je splněn.

$$K = K_{\text{memb/voda}} = \frac{c[\text{membrána}]}{c[\text{voda}]}, \quad (10)$$

kde K je partiční koeficient rozhraní dvou prostředí membrána/voda, $c[\text{membrána}]$ je koncentrace studované látky v membráně, $c[\text{voda}]$ je koncentrace studované látky ve vodě.

3.3.1 Skupina warfarinu

Warfarin je látka používaná k snížení srážlivosti krve (antikoagulancium)⁶⁸⁻⁷¹. Pokud by hrozilo nebezpečí vzniku trombů (sraženin) a s tím zvýšené nebezpečí plicní embólie nebo mozkové mrtvice, je nezbytné podávat právě warfarin nebo jiná účinná antikoagulantia. Warfarin je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2C9, 2C19 a 1A2^{68-71,82}. Na základě toho, který cytochrom jej metabolizuje, můžeme získat 6 různých metabolitů (některé se však liší pouze stereochemickými vlastnostmi). Sledovali jsme i R a S stereoisomery, abychom zjistili, jestli rozdílná orientace jednotlivých atomů ovlivní afinitu k membráně. Z výše zmíněného důvodu jsme do skupiny zařadili i alkoholy RS-warfarinu a SS-warfarinu.

Stereoisomery warfarinu mají stejné hodnoty penetrační bariéry, pozice minima a partičního koeficientu. Všechna minima hydroxyderivátů warfarinu se nachází ve stejné vzdálenosti (1,39 nm) od středu membrány. Minimum warfarinu je blíže k oblasti nízké hustoty acylových řetězců než jeho metabolity. Rozdíly partičních koeficientů ($\Delta \log K$) metabolit-substrát vychází v této skupině všechny záporné. Zjištěné výsledky odpovídají našemu výše zmíněnému předpokladu. Největší rozdíl partičních koeficientů je mezi RS-warfarin alkoholem (nebo SS-warfarin alkoholem) a warfarinem -1,31. Nejnižší rozdíl partičního koeficientu (-0,51) je mezi 7-hydroxy-S-warfarinem (nebo 7-hydroxy-R-warfarinem) a warfarinem.

Tabulka 1 skupiny warfarinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
warfarin	0,90	1,15	4,54	substrát		
7-hydroxy-S-warfarin	8,12	1,39	4,03	0,24	-0,51	2C9
7-hydroxy-R-warfarin	8,12	1,39	4,03	0,24	-0,51	1A2
6-hydroxy-R-warfarin	7,42	1,39	3,90	0,24	-0,64	2C19, 1A2
6-hydroxy-S-warfarin	7,42	1,39	3,90	0,24	-0,64	2C9
RS-warfarin alkohol	1,46	1,46	3,23	0,32	-1,31	ne
SS-warfarin alkohol	1,46	1,46	3,23	0,32	-1,31	ne

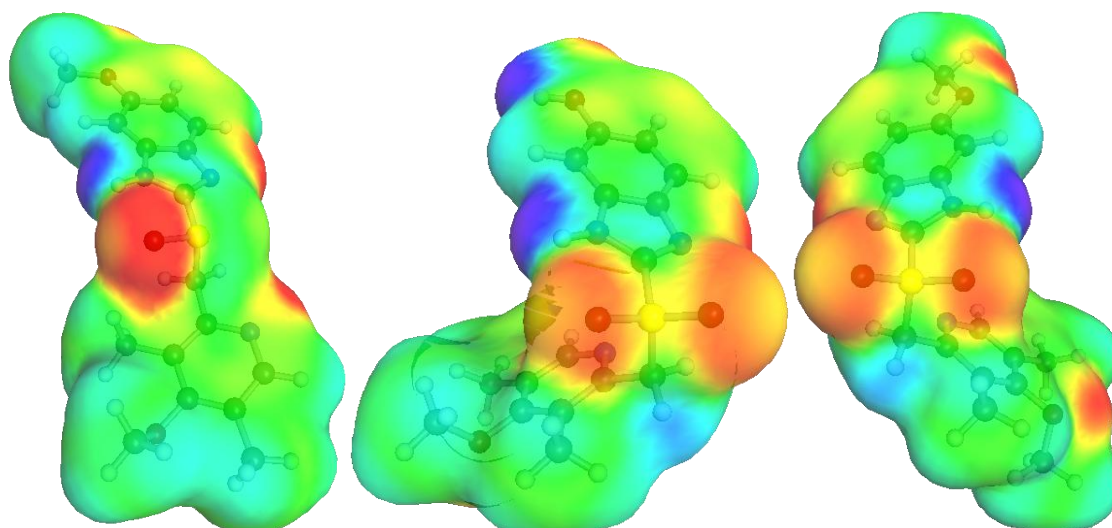
3.3.2 Skupina omeprazolu

Omeprazol je látka snižující produkci žaludečních šťáv při trávení. Omeprazol je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2C9 a 2C19⁶⁸⁻⁷¹.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry (7,40 kcal/mol) ve skupině omeprazolu má 5-0-desmethylomeprazol, což z něj dělá nejméně lipofilní metabolit celé skupiny. Podobně jako ve skupině warfarinu, tak i ve skupině omeprazolu je pozice minima substrátu nejbližší středu membrány. Minimum 5-hydroxyomeprazolu se nachází v oblasti polárních hlav. Ve skupině omeprazolu je rozdíl partičních koeficientů u dvou případů kladný (u sulfonu omeprazolu a 5-0-desmethylomeprazolu). U obou těchto sloučenin je sulfinylová skupina přeměněna na sulfonylovou skupinu (viz obrázek 11). 5-0-desmethylomeprazol se vyskytuje v oblasti polárních hlav, protože sulfonylová skupina a hydroxylová skupina výrazně zvyšují jeho polaritu. Omeprazolsulfon má v srovnání s 5-0-desmethylomeprazolem hydroxylovou skupinu nahrazenou méně polární methoxyskupinou.

Tabulka 2 skupiny omeprazolu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
omeprazol	1,91	1,39	2,82	substrát		
5-hydroxymethylomeprazol	2,79	2,18	2,07	0,79	-0,76	3A4, 2C9, 2C19
omeprazolsulfon	2,66	1,46	3,23	0,08	0,41	3A4
5-0-desmethylomeprazol	7,40	1,94	3,28	0,55	0,46	2C19
3-hydroxyomeprazol	2,24	1,46	2,67	0,08	-0,15	3A4



Obrázek 11 mapy elektrostatického potenciálu (zleva) omeprazolu, 5-0-desmethylomeprazolu a omeprazolsulfonu. U obou metabolitů je sulfinylová skupina přeměněna na sulfonylovou skupinu, čímž vznikne u obou metabolitů navíc jedna oblast negativního elektrostatického potenciálu (značena červenou barvou).

3.3.3 Skupina propranololu

Propranolol je látka používaná k léčbě chorob srdce, migrény a úzkosti⁷². Propranolol je metabolizován cytochromy P450 2D6 a 1A2⁶⁸⁻⁷¹. Některé zdroje uvádějí, že je metabolizován i cytochromem P450 2C19¹.

Nejméně lipofilní látkou skupiny propranololu je 5-hydroxypropranolol s nejvyšší hodnotou penetrační bariéry. U této skupiny je poloha minima N-desisopropylpropranololu blíže středu membrány než poloha minima substrátu. Tato skutečnost je podpořena nižší penetrační bariérou, která naznačuje vyšší lipofilitu N-desisopropylpropranololu ve srovnání s propranololem. Všechny rozdíly partičních koeficientů v této skupině jsou záporné, což odpovídá našemu předpokladu. Rozdíl partičních koeficientů mezi 4-hydroxypropranololem a propranololem je pouze -0,01, což značí podobnou afinitu k membráně u substrátu i jeho metabolitu.

Tabulka 3 skupiny propranololu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
Propranolol	0,96	1,23	4,47			substrát
4'-hydroxypropranolol	2,25	1,31	4,46	0,08	-0,01	2D6
5-hydroxypropranolol	3,02	1,39	3,68	0,16	-0,79	2D6 ⁸³
N-desisopropylpropranolol	0,89	1,22	3,74	-0,01	-0,73	1A2

3.3.4 Skupina estradiolu (17-beta-estradiolu)

Estradiol někdy také označovaný 17-beta-estradiol podle hydroxylové funkční skupiny umístěné v 17-beta poloze. Estradiol patří mezi nejúčinnější savčí estrogeny steroidy⁷². Nejedná se o látku organismu cizí, ale její podávání ženám po menopauze může snižovat možnost vzniku kardiovaskulárních problémů (např. srdeční arytmie, cévní trombózy)⁸⁴. Protože estradiol může být podáván do organismu uměle (množství navíc, které si tělo nesyntetizuje), tak je dobré znát hodnoty partičních koeficientů jednotlivých metabolitů. Estradiol je metabolizován cytochromy P450 3A4 a 1A2⁶⁸⁻⁷¹.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny estradiolu má 2-hydroxyestradiol, a proto bude z celé skupiny nejobtížněji procházet do oblasti nízké hustoty acylových řetězců. Hodnoty rozdílů partičních koeficientů skupiny estradiolu byly záporné až na $\Delta \log K$ 2-hydroxyestradiolu, jehož hodnota byla 0,01. Takto malý rozdíl partičních koeficientů naznačuje, že 2-hydroxyestradiol bude mít podobnou afinitu k membráně jako jeho substrát.

Tabulka 4 skupiny estradiolu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
17-beta-estradiol	2,84	1,31	4,23			substrát
2-hydroxyestradiol	5,05	1,39	4,24	0,08	0,01	3A4, 1A2
4-hydroxyestradiol	2,86	1,39	3,73	0,08	-0,50	3A4
16b-hydroxyestradiol	3,35	1,46	3,25	0,16	-0,98	3A4, 1A2

3.3.5. Skupina acetaminofenu (paracetamolu)

Acetaminofen je volně prodejné léčivo s analgetickými a antipyretickými účinky⁶⁸⁻⁷¹. Někdy se prodává pod názvem paracetamol (zkratka z chemického názvu N-acetyl-p-aminofenol). Při jeho užívání je nezbytné vyvarovat se pití alkoholu, protože acetaminofen v kombinaci s alkoholem je metabolizován na hepatotoxický imin N-acetyl-p-benzochinonu⁸⁵. Acetaminofen je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2D6, 1A2 a 2E1^{1,68-71}. Za zmínku stojí, že acetaminofen může být metabolizován na acetamid a p-benzochinon⁸⁶.

Nejméně lipofilní látkou skupiny acetaminofenu je N-hydroxyacetaminofen s hodnotou penetrační bariéry 7.28 kcal/mol. Rozdíly partičních koeficientů jsou skoro všechny

záporné. Výjimkou je N-hydroxyacetaminofen. Hodnota $\Delta \log K$ N-hydroxyacetaminofenu je 0,18. Odlišné chování N-hydroxyacetaminofenu může být způsobeno přítomností hydroxylové funkční skupiny na atomu dusíku místo vodíku, který má acetaminofen. Hydroxylová skupina zvyšuje polárnost molekuly.

Tabulka 5 skupiny acetaminofenu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, Δpozice je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	Δpozice [nm]	$\Delta \log K$	CYP
acetaminofen	5,11	2,33	1,74	substrát		
N-acetyl-p-benzochinonimin	2,08	1,54	0,97	-0,79	-0,77	2D6, 1A2, 2E1
acetamid	5,74	2,26	0,68	-0,08	-1,06	ne
p-benzochinon	0,85	1,46	1,57	-0,87	-0,17	
N-hydroxyacetaminofen	7,28	2,26	1,92	-0,08	0,18	3A4, 2E1

Fenacetin je nenarkotické analgetikum⁷². Fenacetin je metabolizován cytochromem P450 1A2 na acetaminofen⁶⁸⁻⁷¹. Acetaminofen, ač sám má mnoho metabolitů, je metabolitem fenacetinu. Rozdíl hodnot partičních koeficientů dokazuje, že acetaminofen má menší afinitu k membráně než fenacetin. Minimum acetaminofenu v membráně je v oblasti polárních hlav.

Tabulka 6 skupiny fenacetinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, Δpozice je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	Δpozice [nm]	$\Delta \log K$	CYP
fenacetin	1,97	1,46	2,55	substrát		
acetaminofen	5,11	2,33	1,74	0,87	-0,81	1A2

3.3.6 Skupina alprazolamu

Alprazolam je sloučenina triazolobenzodiazepinu používaná proti úzkosti a k uklidnění organismu⁶⁸⁻⁷¹. Alprazolam je metabolizován cytochromy P450 3A4 a 2C9^{1,68-71}.

Prvním metabolitem skupiny alprazolamu je α -hydroxyalprazolam, který má téměř dvojnásobnou hodnotu penetrační bariéry ve srovnání s alprazolamem. Druhým metabolitem je 4-hydroxyalprazolam se stejnou hodnotou penetrační bariéry jako první metabolit. Substrát i oba metabolity mají stejnou pozici minima v membráně. Toto je první případ v naší studii, kdy je rozdíl pozic minim metabolit-substrát roven nule.

U skupiny alprazolamu jsou oba zjištěné rozdíly partičních koeficientů kladné. Kladné rozdíly partičních koeficientů značí, že oba metabolity mají vyšší afinitu k membráně než jejich substrát.

Tabulka 7 skupiny alprazolamu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
alprazolam	3,17	1,39	2,88	substrát		
α -hydroxyalprazolam	6,12	1,39	3,09	0,00	0,21	3A4, 2C9
4-hydroxyalprazolam	6,12	1,39	3,09	0,00	0,21	3A4, 2C9

3.3.7 Skupina alfentanilu

Alfentanil je opioidní anestetikum. Alfentanil je metabolizován pouze cytochromem P450 3A4^{1,68-71}.

Poloha minima alfentanilu je v oblasti acylových řetězců (středu membrány). První metabolit skupiny alfentanilu je N-fenylpropionamid (AMX)⁸⁷ se stejnou hodnotou penetrační bariéry jako jeho substrát. Rozdíl partičních koeficientů je záporný u AMX. V případě noralfentanilu došlo k odštěpení tetrazolinonu⁸⁸ z atomu dusíku piperidinu (azacyklohexanu). Tato změna struktury může způsobovat vyšší afinitu noralfentanilu k membráně než má alfentanil.

Tabulka 8 skupiny alfentanilu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
alfentanil	1,33	0,99	3,01	substrát		
N-fenylpropionamid	1,33	1,39	2,45	0,40	-0,57	3A4
noralfentanil	1,63	1,15	3,51	0,16	0,50	3A4

3.3.8 Skupina antipyridinu

Antipyridin, jak již název napovídá, je antipyretikum s účinkem proti bolesti (analgetikum)⁶⁸⁻⁷¹. Antipyridin je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2C9, 2C19 a 1A2^{1,68-71}.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny antipyridinu má 3-hydroxymethylantipyridin, jehož hodnota je více než dvojnásobná oproti substrátu. Ve skupině antipyridinu je rozdíl partičních koeficientů záporný pouze u 3-hydroxymethylantipyridinu. První metabolit (norantipyridin) je zadržován v membráně více než substrát. Důvodem vyšší afinity norantipyridinu je odštěpení methylové skupiny vázané na dusíku pyrazolu. Třetí metabolit (4-hydroxyantipyridin) má vyšší afinitu k membráně než antipyridin. Hydroxylová funkční skupina přidává oblast pozitivního i negativního elektrostatického potenciálu na povrch 4-hydroxyantipyridinu. Vyšší hodnota pozitivního i negativního elektrostatického potenciálu v oblasti hydroxylové funkční skupiny 4-hydroxyantipyridinu v kombinaci s orientací molekuly mohou hrát určitou roli ve vyšší afinitě metabolitu k membráně.

Tabulka 9 skupiny antipyridinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
antipyridin	1,89	1,15	1,98	substrát		
norantipyridin	0,83	1,31	2,98	0,16	1,00	2C9, 2C19, 1A2
3-hydroxymethylantipyridin	4,10	1,39	1,55	0,24	-0,43	2C9, 1A2
4-hydroxyantipyridin	2,27	1,31	2,62	0,16	0,64	3A4, 1A2

3.3.9 Skupina atorvastatinu

Atorvastatin patří do skupiny statinů. Statiny snižují hladinu cholesterolu. Atorvastatin je metabolizován pouze cytochromem P450 3A4^{1,68-71}.

Nejvyšší hodnotu partiční bariéry skupiny atorvastatinu má ortho-hydroxyatorvastatin. U skupiny atorvastatinu jsou rozdíly partičních koeficientů kladné. Řádově vyšší afinita ortho-hydroxyatorvastatinu k membráně může být způsobena přítomností dvou intramolekulárních vodíkových vazeb, které způsobují rekonformaci metabolitu.

Tabulka 10 skupiny atorvastatinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
atorvastatin	6,39	1,62	4,72	substrát		
para-hydroxoatorvastatin	5,56	1,54	4,97	-0,08	0,26	3A4
ortho-hydroxoatorvastatin	9,77	1,39	6,13	-0,24	1,41	3A4

3.3.10 Skupina buprenorfinu

Buprenorfin je účinnější a déletrvající analgetikum (tišící bolest) než morfin⁷². Buprenorfin je metabolizován cytochromy P450 3A4 a 2C9^{1,68-71}.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny buprenorfinu má norbuprenorfin. Hydroxybuprenorfin má stejnou hodnotu pozice a stejný partiční koeficient jako buprenorfin. Toto je první případ, kdy nám vychází partiční koeficient metabolitu naprosto stejný jako substrátu a druhý případ, kdy je rozdíl poloh minim metabolit-substrát roven nule. Hydroxybuprenorfin a buprenorfin mají stejnou afinitu k membráně. Rozdíl partičních koeficientů norbuprenorfinu-buprenorfinu je záporný.

Tabulka 11 skupiny buprenorfinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
buprenorfin	1,50	1,07	6,29	substrát		
norbuprenorfin	2,03	1,23	4,04	0,16	-2,25	3A4, 2C9
hydroxybuprenorfin	1,50	1,07	6,29	0,00	0,00	3A4

3.3.11 Skupina kofeinu

Kofein je stimulant centrální nervové soustavy, který zvyšuje pozornost a pohotovost⁷². Kofein je obsažen v čajích (černý a zelený) a zrnech kávy. Skupina kofeinu je dosti rozsáhlá a její studium je důležité, protože snad každý si denně dopřeje aspoň jeden šálek kávy nebo čaje. Kofein je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2C9, 1A2, 2E1^{1,68-71}.

Všechny metabolity skupiny kofeinu mají 2,5 až 3,5 krát vyšší penetrační bariéru než jejich substrát. Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry má kyselina 1,3,7-trimethylmočová.

Polohy minim paraxanthinu, 8-hydroxykofeinu a theobrominu se nacházejí ve stejné vzdálenosti od středu membrány (v oblasti polárních hlav). Pouze kyselina 1,3,7-trimethylmočová má polohu minima mimo membránu. Rozdíly partičních koeficientů skupiny kofeinu jsou záporné u všech metabolitů s výjimkou 8-hydroxykofeinu. Vyšší afinita k membráně u 8-hydroxykofeinu může být způsobena vznikem oblastí s pozitivním a negativním elektrostatickým potenciálem na substituované hydroxylové funkční skupině.

Tabulka 12 skupiny kofeinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
kofein	1,63	1,54	0,90			substrát
8-hydroxykofein	4,98	2,18	1,37	0,63	0,47	3A4 ⁸⁹
1,3,7-trimethylmočová kyselina	5,75	2,73	0,70	1,19	-0,20	3A4, 2C9, 1A2, 2E1
paraxanthin	4,43	2,18	0,78	0,63	-0,12	1A2
theobromin	3,97	2,18	0,71	0,63	-0,19	1A2, 2E1
theofyllin	4,86	2,26	0,89	0,71	-0,01	3A4, 2C9, 1A2, 2E1

3.3.12 Skupina citalopramu

Citalopram patří mezi antidepresiva, selektivní inhibitory příjmu serotoninu⁶⁸⁻⁷¹. Citalopram je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2D6, 2C19^{1,68-71}.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry má propionová kyselina citalopramu. Za zmínku stojí stejná vzdálenost minima Cl-citalopramu a citalopramu (substrátu) od středu membrány. Toto je třetí případ v naší studii, kdy je rozdíl pozic minim metabolit-substrát roven nule. Zvláštní postavení ve skupině citalopramu má *N,N*-didesmethylcitalopram, který je metabolitem, jak již název může napovídat, *N*-desmethylcitalopramu. Rozdíly partičních koeficientů skupiny citalopramu jsou záporné s výjimkou Cl-citalopramu. Vyšší afinita Cl-citalopramu k membráně (oproti substrátu) může být způsobena substitucí chloru za atom fluoru nacházející se v molekule citalopramu. Na povrchu atomu chloru je oblast vyšší hodnoty pozitivního elektrostatického potenciálu ve srovnání s atomem fluoru.

Tabulka 13 skupiny citalopramu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl

hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	log K	Δ pozice [nm]	Δ log K	CYP
citalopram	0,86	1,23	5,10	substrát		
N-desmethylocitalopram	1,12	1,31	4,69	0,08	-0,41	3A4, 2D6, 2C19
propionová kyselina citalopramu	6,58	1,78	3,08	0,55	-2,02	ano ⁹⁰
Cl-citalopram	0,89	1,23	5,43	0,00	0,33	ne
N,N-didesmethylocitalopram	2,34	1,39	3,35	0,16	-1,75	2D6

3.3.13 Skupina clarithromycinu

Clarithromycin je semisyntetické antibiotikum inhibující syntézu bakteriálních proteinů⁶⁸⁻⁷¹. Clarithromycin i jeho metabolity jsou metabolizovány pouze cytochromem P450 3A4^{1,68-71}.

Hodnoty penetračních bariér jednotlivých zástupců skupiny clarithromycinu se od sebe neliší více než o 10 %. Pozice minim substrátu i jeho metabolitů jsou v oblasti acylových řetězců. Vzdálenost minima 14-hydroxyclearithromycinu od středu membrány je stejná jako u substrátu. Toto je čtvrtý případ v naší studii, kdy je rozdíl pozic minim metabolit-substrát roven nule. Rozdíly partičních koeficientů skupiny clarithromycinu jsou záporné, což opětovně potvrzuje náš předpoklad.

Tabulka 14 skupiny clarithromycinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, *log K* je partiční koeficient, Δ *pozice* je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, Δ log *K* je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	log K	Δ pozice [nm]	Δ log K	CYP
clarithromycin	0,95	0,99	6,12	substrát		
14-hydroxyclearithromycin	1,10	0,99	4,66	0,00	-1,46	3A4
N-desmethylclarithromycin	0,96	0,91	5,39	-0,08	-0,74	3A4

3.3.14 Skupina diazepam

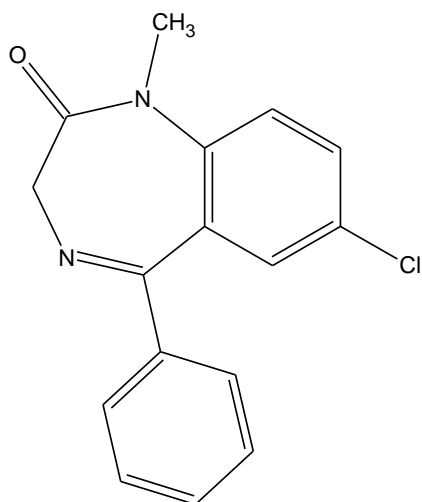
Diazepam je benzodiazepin s antikonvulzivními (protikřečovými), anxiolytickými (proti úzkosti) a uklidňujícími účinky⁶⁸⁻⁷¹. Diazepam je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2C9, 2C19 a 1A2^{1,68-71}.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny diazepam má nordiazepam. Hodnota penetrační bariéry nordiazepam je zhruba třikrát vyšší než substrátu. Rozdíly partičních koeficientů jsou záporné s výjimkou oxazepamu. Vyšší afinita oxazepamu k membráně může být podpořena dalšími oblastmi s pozitivním i negativním

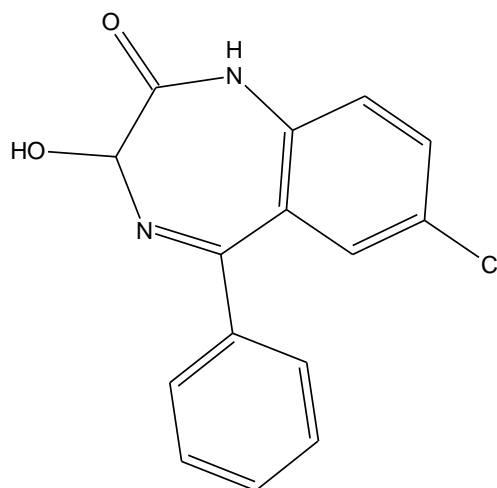
elektrostatickým potenciálem. Další oblasti vznikají substitucí vodíku za hydroxylovou funkční skupinu a substitucí methyly vázaného na atomu dusíku za vodík (viz obrázky 12 a 13).

Tabulka 15 skupiny diazepam. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minima metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
diazepam	1,08	1,15	3,56	substrát		
nordiazepam	2,94	1,39	3,45	0,24	-0,11	3A4, 2C9, 2C19
temazepam	1,52	1,23	3,42	0,08	-0,15	2C19
oxazepam	2,51	1,39	3,91	0,24	0,35	1A2



Obrázek 12 molekula diazepamu



Obrázek 13 molekula oxazepamu

3.3.15 Skupina diklofenaku

Diklofenak je nesteroidní, protizánětlivé léčivo s antipyretickými a analgetickými účinky⁷². Diklofenak je metabolizován cytochromy P450 3A4 a 2C9^{1,68-71}.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry (6,4 krát větší než substrát) skupiny diklofenaku má 5-hydroxydiklofenak. Hodnoty penetračních bariér ostatních metabolitů jsou až 5 krát vyšší než je penetrační bariéra substrátu. Poloha minima diklofenaku je v oblasti acylových řetězců. Rozdíl partičních koeficientů je záporný pouze u 4'-hydroxydiklofenaku. Vyšší afinita k membráně u 3'-hydroxy-4'-methoxydiklofenaku, 3'-hydroxydiklofenaku a 5-hydroxydiklofenaku může být podpořena vyšším počtem oblastí s pozitivním a negativním elektrostatickým

potenciálem (substituce vodíku za hydroxylovou funkční skupinu přidá jednu pozitivní a jednu negativní oblast, substituce atomu vodíku za methoxy skupinu přidá jednu negativní oblast). O řád vyšší hodnota partičního koeficientu u 5-hydroxydiklofenaku je způsobena rekonformací struktury v důsledku vzniku vodíkové vazby (mezi vodíkem vázaným na dusíku a kyslíkem s dvojnou vazbou karboxylové funkční skupiny).

Tabulka 16 skupiny diklofenaku. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
diklofenak	1,00	1,07	4,03	substrát		
4'-hydroxydiklofenak	5,41	1,54	3,38	0,48	-0,65	2C9
3'-hydroxy-4'-methoxydiklofenak	5,33	1,46	4,75	0,40	0,72	ne ⁹¹
3'-hydroxydiklofenak	4,23	1,39	4,23	0,32	0,20	ne ⁹¹
5-hydroxydiklofenak	6,40	1,31	5,11	0,24	1,08	3A4

3.3.16 Skupina dronabinolu

Dronabinol je psychoaktivní látka, izomer 9-tetrahydroxykanabinolu (THC), který se získává z konopí setého³. Dronabinol je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2C9 a 2C19⁶⁸⁻⁷¹.

11-hydroxy- Δ^9 -THC má nejvyšší hodnotu penetrační bariéry (2,5 krát vyšší než u substrátu) ze skupiny dronabinolu. Pozice minima je u 7-hydroxy- Δ^9 -THC stejná jako u substrátu. Toto je pátý případ v naší studii, kdy je rozdíl pozic minim metabolit-substrát roven nule. Pozice minim jsou stejné i u 11-hydroxy- Δ^9 -THC a 8-hydroxy- Δ^9 -THC (1,31 nm). Stejnou vzdálenost od středu membrány mají také 7- α -hydroxy- Δ^9 -THC a 7- β -hydroxy- Δ^9 -THC, které se liší pouze R a S konfigurací (polohou atomu vodíku) na cyklohexenovém cyklu. Rozdíly partičních koeficientů ve skupině dronabinolu jsou u všech metabolitů záporné, což potvrzuje náš předpoklad. Hodnota partičního koeficientu dronabinolu je podobná hodnotě, kterou predikoval zdroj ($\log K_{mw} = 7,0$)².

Tabulka 17 skupiny dronabinolu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
dronabinol	1,3	1,15	7,37	substrát		
11-hydroxy- Δ^9 -THC	3,2	1,31	5,96	0,16	-1,41	3A4, 2C9, 2C19
7-hydroxy- Δ^9 -THC	2,6	1,15	6,39	0,00	-0,97	3A4
7- β -hydroxy- Δ^9 -THC	2,0	1,23	5,90	0,08	-1,46	3A4
7- α -hydroxy- Δ^9 -THC	2,0	1,23	5,90	0,08	-1,46	3A4
8-hydroxy- Δ^9 -THC	2,2	1,31	6,24	0,16	-1,12	3A4

3.3.17 Skupina glyburidu (glibenklamidu)

Glyburid je orálně podávané antihyperglukemikum (snižují hladinu glukózy v krvi)⁶⁸⁻⁷¹. Glyburid a všechny jeho metabolity jsou metabolizovány pouze cytochromy P450 3A4, 2C9, 2C19⁶⁸⁻⁷¹.

Hodnoty penetračních bariér jednotlivých metabolitů skupiny glyburidu se neliší od penetrační bariéry substrátu o více než 16 %. Cis a trans izomery studovaných metabolitů mají stejné hodnoty penetračních bariér, pozic minim a partičních koeficientů. Pozice minima 3-trans-hydroxycyklohexylglyburidu (3-cis-hydroxycyklohexylglyburidu) je v oblasti polárních hlav. Všechny metabolity mají vyšší afinitu k membráně než jejich substrát. Vyšší afinita metabolitů k membráně může být podpořena přítomností dvou oblastí elektrostatických potenciálů (hydroxylové funkční skupiny). Toto vysvětlení nemůžeme použít na 2-trans-hydroxycyklohexylglyburid, jehož pozice minima není v oblasti polárních hlav. O dva řády vyšší hodnota partičního koeficientu je u 4-cis-hydroxycyklohexylglyburidu (4-trans-hydroxycyklohexylglyburidu) způsobena dvěma intramolekulárními vodíkovými vazbami a u 4-trans-hydroxyglyburidu je způsobena jednou intramolekulární vodíkovou vazbou. Vodíkové vazby způsobují rekonformaci molekuly, a tím mění chování metabolitu v membráně.

Tabulka 18 skupiny glyburidu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
glyburid (glibenklamid)	4,83	1,46	3,47	substrát		
2-trans-hydroxycyklohexylglyburid	5,10	1,39	5,74	-0,08	2,27	3A4, 2C9, 2C19
4-cis-hydroxycyklohexylglyburid	5,55	1,54	5,77	0,08	2,30	3A4, 2C9, 2C19
4-trans-hydroxycyklohexylglyburid	5,55	1,54	5,77	0,08	2,30	3A4, 2C9, 2C19
3-trans-hydroxycyklohexylglyburid	4,57	2,02	4,03	0,55	0,56	3A4, 2C9, 2C19
3-cis-hydroxycyklohexylglyburid	4,57	2,02	4,03	0,55	0,56	3A4, 2C9, 2C19
4-trans-hydroxyglyburid	5,58	1,54	5,75	0,08	2,28	3A4, 2C9, 2C19

3.3.18 Skupina fluoxetinu

Fluoxetin je podobně jako citalopram selektivním inhibítorem příjmu serotoninu⁶⁸⁻⁷¹. Fluoxetin je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2D6, 2C9 a 2C19^{1,68-71}.

Hodnota penetrační bariéry para-trifluormethylfenolu je dvacetkrát vyšší než u substrátu. Pozice minim volné energie jsou u substrátu i norfluoxetinu v oblasti acylových řetězců. Rozdíly partičních koeficientů jsou v obou případech záporné. Výrazné snížení afinity para-trifluoromethylfenolu k membráně může být způsobeno nahrazením N-methyl-3-fenylpropan-1-aminu za vodík.

Tabulka 19 skupiny fluoxetinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
fluoxetin	0,17	0,83	7,20	substrát		
norfluoxetin	0,23	0,91	6,33	0,08	-0,86	3A4, 2D6, 2C9, 2C19
para-trifluoromethylfenol	3,44	1,39	3,34	0,55	-3,85	3A4, 2C19

3.3.19 Skupina nevirapinu (nevaripinu)

Nevirapin je léčivo používané k podpoře imunity, když tělo napadne HIV-1 a AIDS. Nevirapin inhibuje reverzní transkriptázu viru, a díky tomu snižuje rozšiřování viru HIV v organismu⁶⁸⁻⁷¹. Nevirapin metabolizují cytochromy P450 3A4, 2D6 a 2C9^{1,68-71}.

Penetrační bariéra 8-hydroxynevirapinu je téměř 4 krát vyšší než je penetrační bariéra substrátu. Rozdíly hodnot partičních koeficientů jsou záporné u 12-hydroxynevirapinu a 8-hydroxynevirapinu. Vyšší afinita 12-hydroxynevirapinu k membráně je důsledkem vzniku intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylovou skupinou a kyslíkem ketoskupiny. Vzniklá vodíková vazba rekonformovala strukturu 12-hydroxynevirapinu.

Tabulka 20 skupiny nevirapinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
nevirapin	1,24	1,23	3,37	substrát		
12-hydroxynevirapin	1,12	1,31	3,42	0,08	0,05	3A4, 2D6, 2C9
2-hydroxynevirapin	2,41	1,46	2,49	0,23	-0,88	3A4
8-hydroxynevirapin	4,66	1,46	3,05	0,24	-0,32	3A4, 2D6

3.3.20 Skupina lovastatinu

Lovastatin patří, podobně jako atorvastatin, do skupiny statinů. Statiny snižují hladinu cholesterolu⁶⁸⁻⁷¹. Lovastatin je substrátem cytochromu P450 3A4¹.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry má 3'-hydroxylovastatin, jehož penetrační bariéra je 1,5 krát vyšší než je penetrační bariéra substrátu. Partiční koeficient 3''-hydroxylovastatinu je poloviční oproti substrátu. Rozdíly všech partičních koeficientů vyšly záporné. Metabolity mají nižší afinitu k membráně než substrát (lovastatin).

Tabulka 21 skupiny lovastatinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
lovastatin	3,67	1,31	5,00	substrát		
3''-hydroxylovastatin	4,29	1,39	2,36	0,08	-2,64	3A4
3'-hydroxylovastatin	5,62	1,46	4,00	0,16	-1,00	3A4
6'-exomethylenlovastatin	1,35	1,23	4,61	-0,08	-0,39	3A4

3.3.21 Skupina paklitaxelu (taxolu)

Paklitaxel je mitotický inhibitor používaný v protinádorové chemoterapii⁶⁸⁻⁷¹. Paklitaxel je substrátem cytochromu P450 3A4^{1,68-71}.

Penetrační bariéra u 6a,3'-p-dihydroxypaklitaxelu je téměř 4 krát vyšší než u substrátu. Druhou nejvyšší hodnotu penetrační bariéry má 3'-p-hydroxypaklitaxel (více než trojnásobnou oproti substrátu). Pozice minima volné energie paklitaxelu se nachází v blízkosti oblasti acylových řetězců. Záporné rozdíly hodnot partičních koeficientů u všech metabolitů znamenají nižší afinitu metabolitů k membráně.

Tabulka 22 skupiny paklitaxelu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
paklitaxel	1,19	1,15	6,14	substrát		
3'-p-hydroxypaklitaxel	4,06	1,39	3,53	0,24	-2,61	3A4
6a-hydroxypaklitaxel	2,59	1,70	4,75	0,55	-1,38	3A4
6a,3'-p-dihydroxypaklitaxel	4,50	1,23	5,88	0,08	-0,26	3A4

3.3.22 Skupina lidokainu

Lidokain je lokální anestetikum používané k potlačení srdeční arytmie⁷². Lidokain je metabolizován cytochromem P450 3A4⁶⁸⁻⁷¹.

Penetrační bariéra 3-hydroxylidokainu je 2,3 krát větší než je penetrační bariéra substrátu. Pozice minim volné energie obou metabolitů jsou dále od středu membrány než substrátu. Vyšší afinita k membráně u 3-hydroxylidokainu může být podpořena dvěma oblastmi elektrostatického potenciálu, které vznikly po substituci vodíku za hydroxylovou funkční skupinu.

Tabulka 23 skupiny lidokainu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
lidokain	1,16	1,15	3,23	substrát		
monoethylglycinexylidid	1,88	1,31	2,42	0,16	-0,81	3A4
3-hydroxylidokain	2,70	1,23	3,49	0,08	0,26	3A4

3.3.23 Skupina meloxicamu

Meloxicam je nesteroidní protizánětlivé léčivo používané jako analgetikum a zmírňující účinky srdeční arytmie⁶⁸⁻⁷¹. Meloxicam je hlavně metabolizován cytochromem 2C9⁶⁸⁻⁷¹ a v menší míře je metabolizován i cytochromem P450 3A4¹.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny meloxicamu má 5'-karboxymeloxicam. Pozice minima volné energie meloxicamu je v oblasti polárních hlav. Vyšší afinita k membráně (oproti substrátu) je u 5'-karboxymeloxicamu i 5'-hydroxymeloxicamu způsobena tautomerním přesmykem atomu vodíku z dusíku na kyslík (z N-H na C=O) za vzniku další hydroxylové funkční skupiny. Vyšší počet hydroxylových funkčních skupin zvyšuje počet oblastí s kladným i záporným elektrostatickým potenciálem. Svůj podíl na zvýšení afinity metabolitů k membráně má i vodíková vazba (mezi O popř. N a H), která v každé studované molekule skupiny meloxicamu způsobuje její rekonformaci.

Tabulka 24 skupiny meloxicamu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
meloxicam	7,69	2,10	3,28	substrát		
5'-karboxymeloxicam	9,60	1,86	3,91	-0,24	0,62	2C9, 3A4
5'-hydroxymethylmeloxicam	3,98	1,31	3,50	-0,79	0,22	2C9, 3A4

3.3.24 Skupina nortriptylinu

Nortriptylin je metabolitem amitriptylinu a patří mezi antidepresiva⁶⁸⁻⁷¹. Nortriptylin je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2D6, 2C19 a 1A2^{1,68-71}.

E-10-hydroxynortriptylin má nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny nortriptylinu. Tato penetrační bariéra je čtyřikrát vyšší ve srovnání se substrátem. Poloha minima volné energie nortriptylinu je v oblasti acylových řetězců. Afinita k membráně u substrátu je vyšší než u jeho metabolitů. Oba metabolity mají nižší partiční koeficienty než jejich substrát.

Tabulka 25 skupiny nortriptylinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
nortriptylin	0,63	1,07	5,75	substrát		
desmethylnortriptylin	1,49	1,15	4,71	0,08	-1,04	2D6, 2C19, 1A2
E-10-hydroxynortriptylin	2,55	1,31	4,39	0,24	-1,36	3A4, 2D6

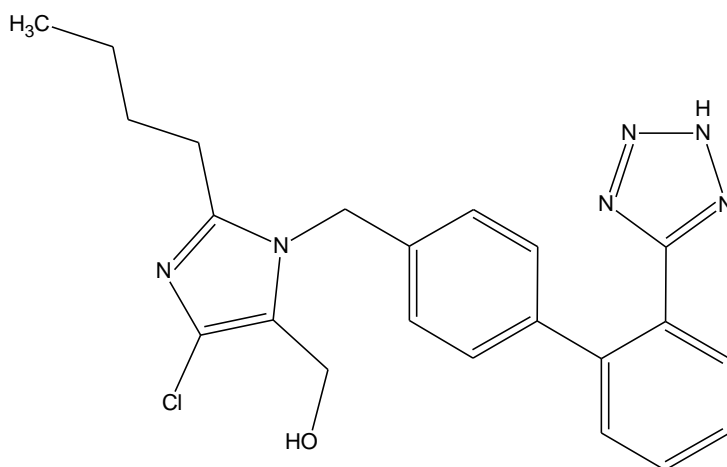
3.3.25 Skupina losartanu

Losartan se používá proti hypertenzi (antagonizuje systém renin-angiotensin-aldosteron). Losartan je metabolizován cytochromy P450 3A4 a 2C9^{1,68-71}.

E-3179 se od struktury losartanu (viz obrázek 14) odlišuje substitucí hydroxymethylové skupiny za aldehydovou funkční skupinu a přesunem vodíku na 2*H*-tetrazolu. Přesunem vodíku vznikne (z 2*H*-tetrazolu) 1*H*-tetrazol. U E-3174 je hydroxymethylová skupina na losartanu nahrazena karboxylovou funkční skupinou. Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny losartanu má substrát. Substrát má také polohu minima volné energie nejbližší ke středu membrány. Rozdíl partičních koeficientů je záporný jen u E-3179. Druhý metabolit má vyšší afinitu k membráně ve srovnání se substrátem. Vyšší afinita u E-3174 může být způsobena intramolekulární halogenovou vazbou mezi vodíkem karboxylové funkční skupiny a atomem chloru.

Tabulka 26 skupiny losartanu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
losartan	5,97	1,23	4,60	substrát		
E-3174	5,16	1,46	4,85	0,24	0,25	3A4, 2C9
E-3179	2,62	1,39	3,71	0,16	-0,89	3A4, 2C9



Obrázek 14 molekula losartanu

3.3.26 Skupina tretinoinu

Tretinoin je v přírodě se vyskytující derivát vitamínu A (retinolu). Tretinoin je regulátorem dělení, proliferace a diferenciacie buněk⁶⁸⁻⁷¹. Tretinoin je metabolizován hlavními cytochromy P450 3A4 a 2C9^{1,68-71}.

Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny tretinoinu má 4-oxoretinová kyselina (3,5 krát vyšší penetrační bariéra než u substrátu). Za zmínku stojí i stejná hodnota penetrační bariéry u 5,6-epoxyretinové kyseliny a substrátu. Minimum volné energie substrátu (tretinoinu) je v oblasti acylových řetězců. 5,6-epoxyretinová kyselina má polohu minima volné energie dále od středu membrány pouze o 7 %. Rozdíly hodnot partičních koeficientů skupiny tretinoinu jsou u všech metabolitů záporné, což potvrzuje náš předpoklad.

Tabulka 27 skupiny tretinoinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minima metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
tretinoin	0,99	0,99	5,74	substrát		
18-hydroxyretinová kyselina	2,21	1,23	3,78	0,24	-1,97	ano
4-hydroxyretinová kyselina	1,77	1,39	3,82	0,40	-1,92	3A4
4-oxoretinová kyselina	3,53	1,54	3,80	0,55	-1,94	ano
5,6-epoxyretinová kyselina	0,99	1,07	3,43	0,08	-2,31	2C9

3.3.27 Skupina midazolamu

Midazolam je sedativum s účinky proti úzkosti. Midazolam se využívá v zubním lékařství a při srdečních operacích jako lokální anestetikum⁶⁸⁻⁷¹. Midazolam je metabolizován cytochromem P450 3A4⁶⁸⁻⁷¹.

Penetrační bariéra obou metabolitů je dvojnásobná ve srovnání se substrátem. α -hydroxymidazolam má o 3% nižší penetrační bariéru než 4-hydroxymidazolam. Midazolam má polohu minima volné energie z celé skupiny nejbliž ke středu membrány. Rozdíl partičních koeficientů je u 4-hydroxymidazolamu záporný. Substrát má vyšší afinitu k membráně než 4-hydroxymidazolam a stejnou afinitu k membráně při porovnání s α -hydroxymidazolamem. V případě skupiny midazolamu můžeme vidět metabolit, co má hodnotu partičního koeficientu shodnou se substrátem.

Tabulka 28 skupiny midazolamu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
midazolam	1,51	1,15	4,00	substrát		
4-hydroxymidazolam	3,00	1,39	3,64	0,24	-0,36	3A4
α -hydroxymidazolam	2,90	1,31	4,00	0,16	0,00	3A4

3.3.28 Skupina ondansetronu

Ondansetron je antagonist receptoru serotoninu typu 3⁹². Používá se k léčbě nevolnosti a zvracení způsobené chemoterapeutickými léčivými (např. cisplatina)⁷². Ondansetron je metabolizován cytochromy P450 3A4, 2D6 a 1A2⁶⁸⁻⁷¹.

Struktury metabolitů ondansetronu jsou metabolizovány cytochromy P450 2D6 a 3A⁹³. Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny ondansetronu má 7-hydroxyondansetron, více než 2,3 krát větší než je penetrační bariéra substrátu. Přítomnost hydroxylové funkční skupiny nejméně dvakrát zvyšuje hodnoty penetračních bariér jednotlivých metabolitů. Všechny tři metabolity ondansetronu mají polohy minim volné energie v oblasti polárních hlav. Rozdíl partičních koeficientů je záporný pouze u prvního metabolitu. Druhý a třetí metabolit mají vyšší afinitu k membráně než substrát. Vyšší hodnoty partičních koeficientů oproti substrátu jsou zapříčiněny polohou hydroxylové funkční skupiny v poloze 7 nebo 8. Změna polohy hydroxylové funkční skupiny posouvá odpovídající oblasti pozitivního a negativního elektrostatického potenciálu. Na skupině ondansetronu můžeme vidět, že rozdílná poloha hydroxylové funkční skupiny výrazně ovlivňuje afinitu molekuly k membráně.

Tabulka 29 skupiny ondansetronu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
ondansetron	2,57	1,31	2,20	substrát		
6-hydroxyondansetron	5,57	2,10	2,16	0,79	-0,05	2D6, 3A ⁹³
7-hydroxyondansetron	5,98	2,18	2,33	0,87	0,13	2D6, 3A ⁹³
8-hydroxyondansetron	5,56	2,18	2,46	0,87	0,26	2D6, 3A ⁹³

3.3.29 Skupina sevofluranu

Sevofluran je etherový inhalační prostředek pro celkovou anestezii⁹⁴. Sevofluran metabolizuje cytochrom P450 2E1 (i když jen z 5 %) na hexafluoroisopropanol s uvolněním oxidu uhličitého a fluoridového aniontu^{68–71,95}.

Fluoridový ion není dále studován, protože ionty nejsou předmětem této studie. Nejvyšší hodnotu penetrační bariéry skupiny sevofluranu má hexafluoroisopropanol, jehož hodnota je 3 krát vyšší než je penetrační bariéra substrátu. Záporný rozdíl partičních koeficientů ukazuje, že metabolit má menší afinitu k membráně než jeho substrát.

Tabulka 30 skupiny sevofluranu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
sevofluran	0,85	1,39	3,37	substrát		
hexafluoroisopropanol	2,35	1,54	2,68	0,16	-0,68	2E1

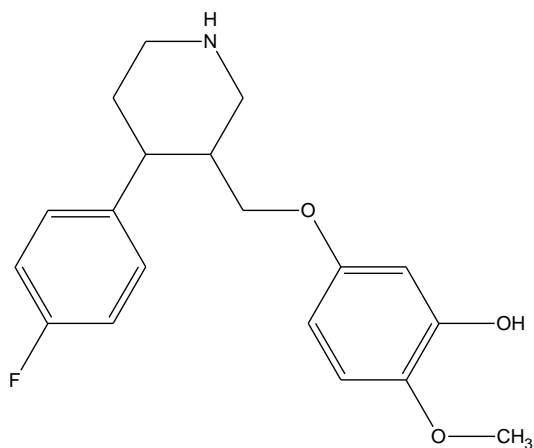
3.3.30 Skupina paroxetinu

Paroxetin je antidepresivum a patří podobně jako citalopram, fluoxetin a ondansetron do skupiny selektivních inhibitorů příjmu serotoninu^{68–71}. Paroxetin je substrátem cytochromu P450 2D6^{1,68–71}.

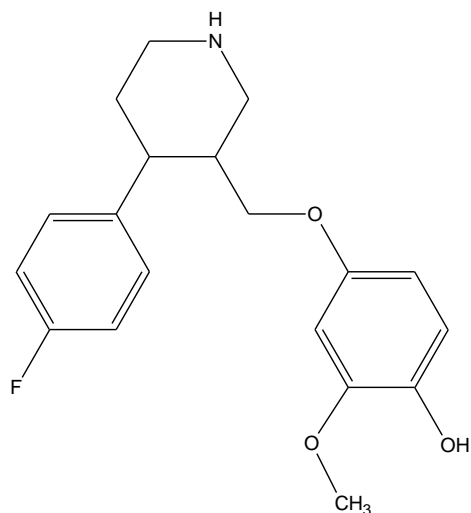
Paroxetin je metabolizován cytochromy P450 za vzniku dvou různých metabolitů (označených zdrojem BRL 36583A, BRL 36610A)⁹⁰. Metabolit BRL 36610A (obrázek 16) má dvojnásobnou hodnotu penetrační bariéry než substrát. Paroxetin má pozici minima volné energie v oblasti acylových řetězců. Oba metabolity mají pozici minima volné energie ve stejné vzdálenosti od středu membrány. Rozdíl hodnot partičních koeficientů skupiny paroxetinu je v obou případech záporný. Metabolity mají nižší afinitu k membráně než substrát.

Tabulka 31 skupiny paroxetinu. Penetrační bariéra ΔG_{pen} v kcal/mol, *pozice* znamená pozice minima (volné energie) ve vzdálenosti od středu membrány v nm, $\log K$ je partiční koeficient, $\Delta pozice$ je rozdíl poloh minim metabolit-substrát, $\Delta \log K$ je rozdíl hodnot partičních koeficientů metabolit-substrát, *CYP* udává cytochromy P450 metabolizující substrát na níže uvedené metabolity.

Látka	ΔG_{pen} [kcal/mol]	pozice [nm]	$\log K$	$\Delta pozice$ [nm]	$\Delta \log K$	CYP
paroxetin	0,76	1,07	5,45	substrát		
BRL 36583A	1,29	1,23	4,63	0,16	-0,81	2D6
BRL 36610A	1,63	1,23	4,77	0,16	-0,68	2D6



Obrázek 15 molekula BRL 36583A, která je metabolitem paroxetinu



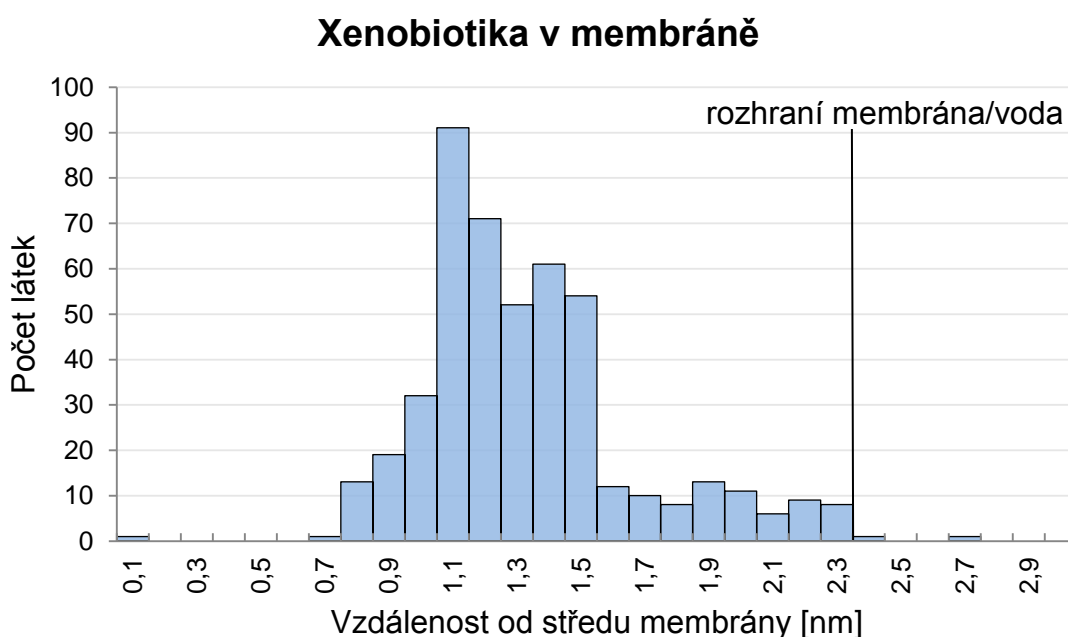
Obrázek 16 molekula BRL 36610A, která je metabolitem paroxetinu

4. Diskuze

Celkem jsme sledovali 134 dvojic metabolit-substrát. Přesně 61 metabolitů obsahuje hydroxylovou funkční skupinu, zatímco jejich substrát tuto hydroxylovou skupinu nemá. Právě cytochromy P450 jsou zodpovědné za hydroxylaci uvedených substrátů. Přítomnost hydroxylové skupiny spolu s polohou minima volné energie má významný vliv na afinitu molekuly k membráně. Pokud se metabolit s hydroxylovou skupinou nachází v oblasti polárních hlav, tak může mít vyšší afinitu k membráně. Pouze 32 metabolitů má vyšší afinitu k membráně než substrát. Z těchto 32 metabolitů má 26 metabolitů vnesenou hydroxylovou funkční skupinu. U devíti hydroxylových metabolitů způsobila vodíková vazba rekonformaci struktury. Metabolit obsahující hydroxylovou funkční skupinu má oproti substrátu navíc dvě oblasti elektrostatického potenciálu (negativní-v okolí atomu kyslíku a pozitivní-v okolí atomu vodíku). Zbývající metabolity s kladným rozdílem partičních koeficientů metabolit-substrát už nemají intramolekulární vodíkové vazby. Za zmínku stojí intramolekulární halogenová vazba metabolitu losartanu E-3174 mezi vodíkem karboxylové funkční skupiny a atomem chloru. Tato interakce zvyšuje afinitu E-3174 k membráně. Struktura noralfentanilu se od svého substrátu alfentanilu liší odštěpením tetrazolinonu z atomu dusíku piperidinu (azacyklohexanu). Tato změna struktury stojí za zvýšením afinity noralfentanilu k membráně. Struktura norantipyridinu se od antipyridinu (substrátu) liší methylovou skupinou odštěpenou z dusíku pyrazolu. Odštěpením methylové skupiny se na atomu dusíku pyrazolu objeví oblast negativního elektrostatického potenciálu, která zvyšuje afinitu norantipyridinu k membráně. Poslední skupinou s metabolity mající vyšší afinitu k membráně než substrát je skupina omeprazolu. 5-O-desmethylomeprazol a omeprazolsulfon mají kladný rozdíl partičních koeficientů metabolit-substrát, protože u obou metabolitů je sulfínylová skupina nahrazena sulfonylovou skupinou. Náhrada sulfínylové skupiny za sulfonylovou skupinu přidává jednu oblast negativního elektrostatického potenciálu (v oblasti přidaného kyslíku) na povrch metabolitu (viz obrázek 11 v experimentální části).

Kanonický vzorec popisuje pouze planární molekulu, ale isomerní vzorec popisuje navíc vzájemnou orientaci vybraných atomů. Pokud po optimalizaci máme stejné struktury, potom mají stejné hodnoty penetračních bariér, partičních koeficientů a pozic minim.

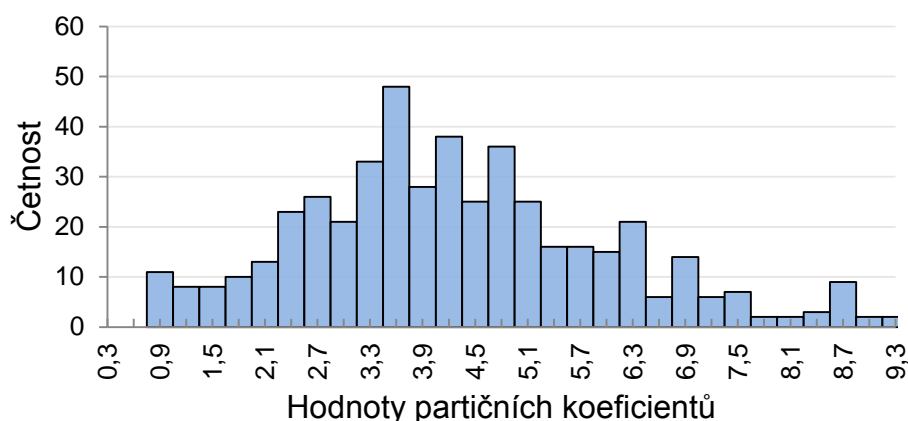
Pokud dále nebude uvedeno jinak, tak se rozumí, že poloha minima volné energie látky znamená oblast, kde se látka vyskytuje. Z celkového počtu 474 studovaných látek se největší množství látek (91) vyskytuje ve vzdálenosti 1,1 nm od středu membrány (viz graf 2). Ve vzdálenosti 1,0 až 1,4 nm od středu membrány se nachází 69,4 % nými sledovaných látek. V oblasti nízké hustoty acylových řetězců se vyskytuje pouze jediná látka (perhexilin). Další studované látky se nachází až od vzdálenosti 0,7 nm od středu membrány. Nejvzdálenější studovanou látkou je metabolit kofeinu kyselina 1,3,7-trimethylmočová, která se nachází mimo membránu ve vzdálenosti 2,7 nm od jejího středu.



Graf 2 xenobiotika v membráně. Udává, kolik molekul má polohu minima volné energie v dané vzdálenosti od středu membrány. Rozhraní membrána/voda se nachází ve vzdálenosti 2,3 nm od středu membrány.

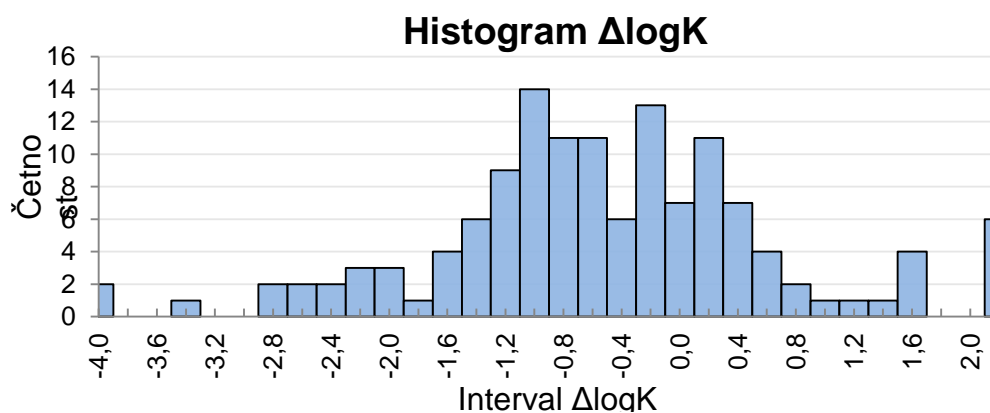
Následující graf (graf 3) ukazuje hodnoty jednotlivých partičních koeficientů. Partiční koeficienty jsou rozděleny do 31 intervalů vždy po 0,3. Nejvíce sledovaných molekul (48) má partiční koeficienty v intervalu (3,3;3,6>. Nejnižší partiční koeficienty jsou v intervalu (0,6;0,9>, kde se nacházelo 11 látek. Za zmínku stojí i interval (9,0;9,3>, ve kterém je pouze molekula flunarizinu.

Srovnání partičních koeficientů



Graf 3 četnosti partičních koeficientů (v intervalech po 0,3) všech 474 studovaných látek

Z histogramu rozdílů partičních koeficientů můžeme vyčíst, kolik studovaných látek má záporný rozdíl partičních koeficientů metabolit-substrát (viz graf 4). Z celkového počtu studovaných metabolitů se více než 67 % chová dle našeho předpokladu a má nižší afinitu k membráně než jejich substrát. Cytochromy P450 metabolizují léčiva na hydrofilnější metabolity, které se ve většině případů snadněji dostávají z membrány. Největší počet metabolitů (14) se nachází v intervalu $<-1,0; -0,8$). Z grafu 3 můžeme vyčíst také počet metabolitů s podobnou hodnotou partičního koeficientu, jako má substrát. Sedm metabolitů z intervalu $<0,0; 0,2$ má podobnou afinitu k membráně jako substrát. Pouze dva metabolity ze studované skupiny látek mají hodnotu partičního koeficientu totožnou s hodnotou partičního koeficientu metabolitu.



Graf 4 histogram rozdílů partičních koeficientů (počítaných podle vzorce 6) jednotlivých metabolitů

5. Závěr

Z celkového počtu studovaných metabolitů se více než 67 % chová dle našeho předpokladu a má nižší afinitu k membráně než jejich substrát. Největší skupina studovaných metabolitů vzniká hydroxylací substrátů cytochromy P450. V několika případech se k hydroxylové skupině přidává i vodíková vazba. Hydroxylová skupina přináší na povrch metabolitu oblast negativního a pozitivního elektrostatického potenciálu, zatímco vodíková vazba rekonformuje strukturu metabolitu. Pokud se poloha minima volné energie metabolitu nachází v oblasti hydrofilních hlav, potom může metabolit s hydroxylovou skupinou mít vyšší afinitu k membráně než jeho substrát (N-hydroxyacetaminofen a 8-hydroxykofein). Celý problém je ale mnohem složitější, protože musíme brát v úvahu i hloubku potenciálu ovlivněnou afinitou metabolitu k vodě.

Nemalou roli ve stanovení hodnoty partičního koeficientu má i poloha hydroxylové skupiny. U skupiny ondansetronu má 6-hydroxyderivát nižší afinitu k membráně, zatímco 7-hydroxyondansetron a 8-hydroxyondansetron mají afinitu k membráně vyšší než jejich substrát.

Výjimečnými případy jsou hydroxybuprenorfin (metabolit buprenorfinu) a α -hydroxymidazolam (metabolit midazolamu), které mají totožnou hodnotu partičního koeficientu jako jejich substrát. Hydroxybuprenorfin a buprenorfin mají dokonce stejnou vzdálenost od středu membrány. Za zmínku stojí i skupina látek s rozdílem partičních koeficientů velmi blízkým nule (znázorněné v grafu 4 v intervalu $<0,0;0,2$). Tato skupina obsahuje 7 různých metabolitů.

Zajímavé jsou skupiny alprazolamu, glyburidu, atorvastatinu a meloxicamu. Všechny metabolity těchto skupin mají vyšší afinitu k membráně než jejich substrát. Všechny metabolity skupin atorvastatinu a meloxicamu jsou blíže ke středu membrány než jejich substrát a mají vyšší afinitu k membráně. Toto chování není možné ani částečně vysvětlit prostřednictvím interakce hydroxylové skupiny s oblastí polárních hlav membrány, protože některé metabolity s hydroxylovou skupinou jsou mimo oblast hydrofilních hlav. Další zajímavě se chovající skupinou je skupina alprazolamu. Ve skupině alprazolamu jsou metabolity stejně daleko od středu membrány jako jejich substrát a jsou mimo oblast hydrofilních hlav. Poslední zajímavou skupinou je skupina glyburidu. Vyšší afinitu metabolitů této skupiny můžeme

(kromě 2-trans-hydroxycyklohexylglyburidu) částečně vysvětlit pomocí interakce hydroxylové funkční skupiny s oblastí polárních hlav membrány. 2-trans-hydroxycyklohexylglyburid se vyskytuje blíže ke středu membrány než jeho substrát a tudíž mimo oblast polárních hlav, a přesto má vyšší afinitu k membráně než jeho substrát. Substrát každé skupiny má odlišnou strukturu, různé substituenty a patří do jiné skupiny léčiv. Přes všechny tyto rozdíly mají všechny metabolity těchto skupin vyšší afinitu k membráně než substrát. Z důvodu stejného chování všech metabolitů v těchto vybraných skupinách se nabízí otázka: „Není vyšší afinita těchto metabolitů k membráně nezbytná pro jejich správný účinek v organismu?“ Toto je otázka, kterou už v této diplomové práci nevyřeším.

6. Summary

We studied here the drugs (substrates) metabolized by six major cytochromes P450 (3A4, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 2E1). Totally, we studied approximately 134 metabolite-substrate pairs divided into 30 groups. Each group has one substrate and at least three metabolites (if one group has three metabolites than we have three metabolite-substrate pairs from this group). Our approach consists of comparison of these 30 substances with their known metabolites. We observed that in 67 % cases the studied metabolites have lesser affinity to membrane than their substrates. Substrates are metabolized by six major cytochromes P450 and two thirds of these metabolites have lesser affinity to the membrane than their substrates.

The novel insight of our approach is using program COSMOmic which is a program based on quantum-chemical calculations and a statistical thermodynamic algorithm. This algorithm is used for pairing of interacting surfaces.² As a model for a membrane we chose DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). We obtained values of partition coefficients, penetration barriers and position of minima (free energy) from the center of the membrane. We calculated the differences between partition coefficients (obtained from program COSMOmic) of metabolites and corresponding substrates.

If the difference of partition coefficients is positive, then the affinity of the metabolite to the membrane is higher than its substrate. We checked whether added substituent on metabolite would change the value of substrate partition coefficient. The largest group of studied metabolites is composed of 61 hydroxy metabolites. In some cases intramolecular hydrogen bond is present in hydroxy metabolites with higher affinity to the membrane. Hydroxyl group brings two areas of electrostatic potential (one negative-oxygen atom and one positive-hydrogen atom) on surface of the molecule. Higher affinity of the metabolite to the membrane (compared to its substrate) can be partly caused in two cases (N-hydroxyacetaminophen and 8-hydroxycaffeine) by hydroxyl group together with position of the metabolite in the area of hydrophilic heads (between 1.5 nm and 2.5 nm from the center of the membrane). The explanation of higher affinity of hydroxymetabolites to the membrane is not as simple as that. We need to take into account that potential depth influences affinity of the metabolite to the water.

Important role in determination of value of partition coefficient plays also a location of the functional groups (e.g. hydroxyl group). In group of ondansetron we have studied 6-hydroxyondansetron, 7-hydroxyondansetron and 8-hydroxyondansetron. It is worth mentioning that only 6-hydroxyondansetron has lower affinity to the membrane than its substrate. Location of the hydroxyl group in the group of ondansetron determines the value of partition coefficient.

Exceptional cases are metabolites with the same (or very similar) affinity to the membrane as their substrates. Such cases are hydroxybuprenorphine and α -hydroxymidazolam, whose values of partition coefficients are exactly the same as their substrates. We should not forget that 7 metabolites exist with difference of partition coefficients close to zero in graph 3 (in interval $<0,0; 0,2$). If the metabolites have very similar partition coefficients as their substrates, then they also have similar affinity to the membrane.

There are four groups of drugs that all have metabolites with higher affinity to the membrane than their substrates. All metabolites of atorvastatin and meloxicam group are closer to the center of the membrane than their substrates and they still have higher affinity to the membrane than their substrates. It is not known why these metabolites have higher affinity to the membrane. Their position is out of the area of hydrophilic heads. Another interesting group is group of alprazolam. In the alprazolam group are metabolites as far from the center of the membrane as their substrate (out of the area of hydrophilic heads), but they have higher affinity to the membrane than their substrate. The last interesting group is group of glyburide. Higher affinity of metabolites can be partly explained (except 2-trans-hydroxycyklohexylglyburide) by interaction of hydroxyl group with area of hydrophilic heads. 2-trans-hydroxycyklohexylglyburide (2-HCG) is closer to the center of the membrane than its substrate. 2-HCG is out of the area of hydrophilic heads but it still has higher affinity than its substrate. Substrate of each group has different structure, various substituents and belongs to other group of drugs. Despite all these differences all metabolites of these groups have higher affinity to the membrane than their substrates. Metabolites of drugs (atorvastatin, meloxicam, alprazolam and glyburide) have higher affinity to the membrane in spite of the fact that they are not in the area of hydrophilic heads.

7. Seznam literatury

- (1) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 737–747.
- (2) Klamt, A.; Huniar, U.; Spycher, S.; Keldenich, J. COSMOmic: A Mechanistic Approach to the Calculation of Membrane-Water Partition Coefficients and Internal Distributions within Membranes and Micelles. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12148–12157.
- (3) Jakubczyk, D.; Cheng, J. Z.; O'Connor, S. E. Biosynthesis of the Ergot Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1328–1338.
- (4) Krämer, S. D.; Abbott, N. J.; Begley, D. J. Biological Models to Study Blood-Brain Barrier Permeation. In *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*; Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R., Eds.; Zürich, 2001; pp 127–153.
- (5) Cooper, G. M.; Hausman, R. E. *The Cell: A Molecular Approach*, Fourth Edi.; Sunderland, Ed.; Sinauer Associates: Sunderland (MA), 2000.
- (6) C. Peetla, A. Stine, V. L. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol Pharm.* **2009**, *6*, 1264–1276.
- (7) Engelman, D. M. Membranes Are More Mosaic than Fluid. *Nature* **2005**, *438*, 578–580.
- (8) Marrink, S. J.; Berendsen, H. J. C. Permeation Process of Small Molecules across Lipid Membranes Studied by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16729–16738.
- (9) Otyepka, M.; Skopalík, J.; Anzenbacherová, E.; Anzenbacher, P. What Common Structural Features and Variations of Mammalian P450s Are Known to Date? *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 376–389.
- (10) Van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112–124.
- (11) Groves, J. T. Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action. In *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry.*; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2004; pp 1–34.
- (12) Nebert, D. W.; Nelson, D. R.; Kamataki, T.; Waxman, D. J.; Guengerich, F. P.; Estabrook, R. W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F. J.; Coon, M. J.; Gunsalus, I. C.; Gotoh, O.; Okuda, K. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*, 1–51.
- (13) Zanger, U. M.; Schwab, M. Cytochrome P450 Enzymes in Drug Metabolism: Regulation of Gene Expression, Enzyme Activities, and Impact of Genetic Variation. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 103–141.
- (14) Thummel, K. E.; Wilkinson, G. R. In Vitro and in Vivo Drug Interactions Involving Human CYP3A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38*, 389–430.

- (15) Schmider, J.; Brockmöller, J.; Arold, G.; Bauer, S.; Roots, I. Simultaneous Assessment of CYP3A4 and CYP1A2 Activity in Vivo with Alprazolam and Caffeine. *Pharmacogenetics*, 1999, 9, 725–734.
- (16) Skopalík, J.; Anzenbacher, P.; Otyepka, M. Flexibility of Human Cytochromes P450: Molecular Dynamics Reveals Differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, Which Correlate with Their Substrate Preferences. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 8165–8173.
- (17) Sladek, N. E.; Mannering, G. J. Evidence for a New P-450 Hemoprotein in Hepatic Microsomes from Methylcholanthrene Treated Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, 24, 668–674.
- (18) Guengerich, F. P. *Human Cytochrome P450 Enzymes. In: Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry.*; de Montellano, O., Ed.; Plenum, New York, 1995; pp 473–535.
- (19) Lampe, J. W.; King, I. B.; Li, S.; Grate, M. T.; Barale, K. V; Chen, C.; Feng, Z.; Potter, J. D. Brassica Vegetables Increase and Apiaceous Vegetables Decrease Cytochrome P450 1A2 Activity in Humans : Changes in Caffeine Metabolite Ratios in Response to Controlled Vegetable Diets Allium and Apiaceous Vegetable Diets Differed Significantly. **2000**, 21, 1157–1162.
- (20) Eaton, D. L.; Gallagher, E. P.; Bammler, T. K.; Kunze, K. L. Role of Cytochrome P4501A2 in Chemical Carcinogenesis: Implications for Human Variability in Expression and Enzyme Activity. *Pharmacogenetics*, 1995, 5, 259–274.
- (21) Nakajima, M.; Yokoi, T.; Mizutani, M.; Kinoshita, M.; Funayama, M.; Kamataki, T. Genetic Polymorphism in the 5'-Flanking Region of Human CYP1A2 Gene: Effect on the CYP1A2 Inducibility in Humans. *J. Biochem.* **1999**, 125, 803–808.
- (22) Anzenbacherová, E.; Bec, N.; Anzenbacher, P.; Hudecek, J.; Soucek, P.; Jung, C.; Munro, a W.; Lange, R. Flexibility and Stability of the Structure of Cytochromes P450 3A4 and BM-3. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 2916–2920.
- (23) Anzenbacher, P.; Bec, N.; Hudecek, J.; Lange, R. HIGH CONFORMATIONAL STABILITY OF CYTOCHROME P-450 1A2 . EVIDENCE FROM UV ABSORPTION SPECTRA Cytochromes P-450 (P-450) Are Enzymes Known to Hydroxylate a Variety of Non-Polar Substrates of Both Endogenous and Exogenous Origin . Individual P-450 Subfamili. **1998**, 63, 441–448.
- (24) Guidice, J. M.; Marez, D.; Sabbagh, N.; Legrand-Andreoletti, M.; Spire, C.; Alcaïde, E.; Lafitte, J. J.; Broly, F. Evidence for CYP2D6 Expression in Human Lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 241, 79–85.
- (25) Smith, R. L.; Idle, J. R.; Maghoub, A. A.; Sloan, T. P.; Lancaster, R. Genetically Determined Deffects of Oxidation at Carbon Centres of Drugs. *Lancet* **1978**, 943-944.
- (26) Rowland, P.; Blaney, F. E.; Smyth, M. G.; Jones, J. J.; Leydon, V. R.; Oxbrow, A. K.; Lewis, C. J.; Tennant, M. G.; Modi, S.; Eggleston, D. S.; Chenery, R. J.; Bridges, A. M. Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 7614–7622.

- (27) Wester, M. R.; Lasker, J. M.; Johnson, E. F.; Raucy, J. L. CYP2C19 Participates in Tolbutamide Hydroxylation by Human Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 354–359.
- (28) Smith, D. a.; Ackland, M. J.; Jones, B. C. Properties of Cytochrome P450 Isoenzymes and Their Substrates. Part 2: Properties of Cytochrome P450 Substrates. *Drug Discov. Today* **1997**, *2*, 479–486.
- (29) Ingelman-Sundberg, M.; Oscarson, M.; McLellan, R. a. Polymorphic Human Cytochrome P450 Enzymes: An Opportunity for Individualized Drug Treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 342–349.
- (30) Salmela, K. S.; Kessova, I. G.; Tsyrllov, I. B.; Lieber, C. S. Respective Roles of Human Cytochrome P-450E1 , 1A2, and 3A4 in the Hepatic Microsomal Ethanol Oxidizing System. **1998**, 2125–2132.
- (31) Bertz, R. J.; Granneman, G. R. Use of in Vitro and in Vivo Data to Estimate the Likelihood of Metabolic Pharmacokinetic Interactions. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *32*, 210–258.
- (32) Guengerich, F. P.; Shimada, T. Oxidation of Toxic and Carcinogenic Chemicals by Human Cytochrome P-450 Enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 391–407.
- (33) Yamazaki, H.; Guo, Z.; Guengerich, F. P. Selectivity of Cytochrome P450E1 in Chlorzoxazone 6-Hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, *23*, 438–440.
- (34) Manyike, P. T.; Kharasch, E. D.; Kalhorn, T. F.; Slattery, J. T. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to Acetaminophen Reactive Metabolite Formation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, *67*, 275–282.
- (35) Ioannides, C. Effect of Diet and Nutrition on the Expression of Cytochromes P450. *Xenobiotica.* **1999**, *29*, 109–154.
- (36) Yeagle, P. L. Cell Membrane Features. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*; John Wiley & Sons: Chichester, 2001; pp 1–7.
- (37) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, fifth.; Anderson, M., Granum, S., Eds.; 2008.
- (38) Paloncýová, M. Simulace Látek Na Buněčných Membránách, Palacký University, 2012, pp 1–50.
- (39) Paloncýová, M.; Devane, R.; Murch, B.; Berka, K.; Otyepka, M. Amphiphilic Drug-like Molecules Accumulate in a Membrane below the Head Group Region. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1030–1039.
- (40) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R. C.; Nishijima, M.; Raetz, C. R. H.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M. J. O.; Dennis, E. A. Update of the LIPID MAPS Comprehensive Classification System for Lipids. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S9–S14.
- (41) Subramaniam, S.; Fahy, E.; Gupta, S.; Sud, M.; Byrnes, R. W.; Cotter, D.; Dinasarapu, A. R.; Maurya, M. R. Bioinformatics and Systems Biology of the Lipidome. *Chem. Rev.* **2012**, *111*, 6452–6490.

- (42) Ebert, D.; Haller, R. G.; Walton, M. E. Energy Contribution of Octanoate to Intact Rat Brain Metabolism Measured by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 5928–5935.
- (43) Marin-Valencia, I.; Good, L. B.; Ma, Q.; Malloy, C. R.; Pascual, J. M. Heptanoate as a Neural Fuel: Energetic and Neurotransmitter Precursors in Normal and Glucose Transporter I-Deficient (G1D) Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *33*, 175–182.
- (44) Coleman, R. a.; Lee, D. P. Enzymes of Triacylglycerol Synthesis and Their Regulation. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 134–176.
- (45) Henry, S. a.; Kohlwein, S. D.; Carman, G. M. Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* **2012**, *190*, 317–349.
- (46) Hölzl, G.; Dörmann, P. Structure and Function of Glycoglycerolipids in Plants and Bacteria. *Prog. Lipid Res.* **2007**, *46*, 225–243.
- (47) Ivanova, P. T.; Milne, S. B.; Byrne, M. O.; Xiang, Y.; Brown, H. A. Glycerophospholipid Identification and Quantitation by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Methods Enzymol.* **2007**, *432*, 21–57.
- (48) Farooqui, A. a.; Horrocks, L. a.; Farooqui, T. Glycerophospholipids in Brain: Their Metabolism, Incorporation into Membranes, Functions, and Involvement in Neurological Disorders. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 1–29.
- (49) Pruetz, S. T.; Bushnev, A.; Hagedorn, K.; Adiga, M.; Haynes, C. a; Sullards, M. C.; Liotta, D. C.; Merrill, A. H. Biodiversity of Sphingoid Bases (“sphingosines”) and Related Amino Alcohols. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1621–1639.
- (50) Hori, T.; Sugita, M. Sphingolipids in Lower Animals. *Prog. Lipid Res.* **1993**, *32*, 25–45.
- (51) Wiegandt, H. Insect Glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1992**, *1123*, 117–126.
- (52) Guan, X.; Wenk, M. R. Biochemistry of Inositol Lipids. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 3239–3251.
- (53) ChemSketch, Version 12.01, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, [Www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2010.
- (54) Rhen, T.; Cidlowski, J. a. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids--New Mechanisms for Old Drugs. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1711–1723.
- (55) Kuzuyama, T.; Seto, H. Diversity of the Biosynthesis of the Isoprene Units. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 171–183.
- (56) Li, J.; Gou, X. Brassinosteroids. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*; John Wiley & Sons: Chichester, 2007; pp 1–9.
- (57) Rao, a. V.; Rao, L. G. Carotenoids and Human Health. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 207–216.

- (58) Tholl, D. Terpene Synthases and the Regulation, Diversity and Biological Roles of Terpene Metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 297–304.
- (59) Raetz, C. R. H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635–700.
- (60) Tzeng, Y. L.; Datta, A.; Kumar Kolli, V.; Carlson, R. W.; Stephens, D. S. Endotoxin of *Neisseria Meningitidis* Composed Only of Intact Lipid A: Inactivation of the Meningococcal 3-Deoxy-D-Manno-Octulosonic Acid Transferase. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2379–2388.
- (61) Kealey, J. T.; Liu, L.; Santi, D. V; Betlach, M. C.; Barr, P. J. Production of a Polyketide Natural Product in Nonpolyketide-Producing Prokaryotic and Eukaryotic Hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 505–509.
- (62) Peters, S. A. Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations. In: John Wiley & Sons: New Jersey, Hoboken, 2012; pp 17–88.
- (63) Uchimura, T.; Kato, M.; Saito, T.; Kinoshita, H. Prediction of Human Blood-to-Plasma Drug Concentration Ratio. *Biopharm. Drug Dispos.* **2010**, *31*, 286–297.
- (64) Paixão, P.; Gouveia, L. F.; Morais, J. a G. Prediction of Drug Distribution within Blood. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *36*, 544–554.
- (65) Orsi, M.; Essex, J. Passive Permeation Across Lipid Bilayers: A Literature Review. In *MOLECULAR SIMULATIONS AND BIOMEMBRANES: FROM BIOPHYSICS TO FUNCTION*; Sansom, M., Biggin, P., Eds.; ROYAL SOC CHEMISTRY: Cambridge, 2010; pp 76–90.
- (66) Klamt, A.; Eckert, F. COSMO-RS: A Novel and Efficient Method for the a Priori Prediction of Thermophysical Data of Liquids. *Fluid Phase Equilib.* **2000**, *172*, 43–72.
- (67) Klamt, A.; Eckert, F. COSMOthermX12.01, 2012.
- (68) Law, V.; Knox, C.; Djoumbou, Y.; Jewison, T.; Guo, A.; Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, W. D. DrugBank 4.0: Shedding New Light on Drug Metabolism. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D1091–D1097.
- (69) Knox, C.; Law, V.; Jewison, T.; Liu, P.; Ly, S.; Frolkis, A.; Pon, A.; Banco, K.; Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, W. D. DrugBank 3.0: A Comprehensive Resource for “Omics” Research on Drugs. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D1035–D1041.
- (70) Wishart, D.; Knox, C.; Guo, A.; Cheng, D.; Shrivastava, S.; Tzur, D.; Gautam, B.; Hassanali, M. DrugBank: A Knowledgebase for Drugs, Drug Actions and Drug Targets. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D901–D906.
- (71) Wishart, D.; Knox, C.; Guo, A.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. DrugBank: A Comprehensive Resource for in Silico Drug Discovery and Exploration. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D668–D672.
- (72) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, 23. 9. 2014.

- (73) <http://www.chemspider.com/>, 23. 9. 2014.
- (74) Preissner, S.; Kroll, K.; Dunkel, M.; Goldsobel, G.; Kuzmann, D.; Senger S., Günther S., Winnenburt R., S. M. and P. R. SuperCYP: A Comprehensive Database on Cytochrome P450 Enzymes Including a Tool for Analysis of CYP-Drug Interactions. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D237–D243.
- (75) Klamt, A.; Schüürmann, G. COSMO: A New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and Its Gradient. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 799.
- (76) Mullins, E.; Oldland, R.; Liu, Y. a.; Wang, S.; Sandler, S. I.; Chen, C. C.; Zwolak, M.; Seavey, K. C. Sigma-Profile Database for Using COSMO-Based Thermodynamic Methods. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 4389–4415.
- (77) Klamt, A. The COSMO and COSMO-RS Solvation Models. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 699–709.
- (78) Klamt, A.; Eckert, F.; Arlt, W. COSMO-RS: An Alternative to Simulation for Calculating Thermodynamic Properties of Liquid Mixtures. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2010**, *1*, 101–122.
- (79) Eckert, F. *COSMOtherm Users Manual*; COSMOlogic GmbH & Co KG: Leverkusen, Germany; pp 1–206.
- (80) Stefanis, E.; Panayiotou, C. A New Expanded Solubility Parameter Approach. *Int. J. Pharm.* **2012**, *426*, 29–43.
- (81) Gmehling, J. Present Status of Group-Contribution Methods for the Synthesis and Design of Chemical Processes. *Fluid Phase Equilib.* **1998**, *144*, 37–47.
- (82) Chan, E.; McLachlan, a J.; Pegg, M.; MacKay, a D.; Cole, R. B.; Rowland, M. Disposition of Warfarin Enantiomers and Metabolites in Patients during Multiple Dosing with Rac-Warfarin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *37*, 563–569.
- (83) Narimatsu, S.; Kobayashi, N.; Masubuchi, Y.; Horie, T.; Kakegawa, T.; Kobayashi, H.; Hardwick, J. P.; Gonzalez, F. J.; Shimada, N.; Ohmori, S.; Kitada, M.; Asaoka, K.; Kataoka, H.; Yamamoto, S.; Satoh, T. Species Difference in Enantioselectivity for the Oxidation of Propranolol by Cytochrome P450 2D Enzymes. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *127*, 73–90.
- (84) Smith, N. L.; Blondon, M.; Wiggins, K. L.; Harrington, L. B. Lower Risk of Cardiovascular Events in Postmenopausal Women Taking Oral Estradiol Compared With Oral Conjugated Equine Estrogens. *JAMA Intern Med.* **2013**, *174*, 25–34.
- (85) Thummel, K. E.; Slattery, J. T.; Ro, H.; Chien, J. Y.; Nelson, S. D.; Lown, K. E.; Watkins, P. B. Ethanol and Production of the Hepatotoxic Metabolite of Acetaminophen in Healthy Adults. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, *67*, 591–599.
- (86) Hinson, J. A. Reactive Metabolites of Phenacetin and Acetaminophen: A Review. *Environ. Health Perspect.* **1983**, *49*, 71–79.

- (87) Klees, T. M.; Sheffels, P.; Dale, O.; Kharasch, E. D. Metabolism of Alfentanil by Cytochrome P4503A (CYP3A) Enzymes. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 303–311.
- (88) Awadallah, A.; Kowski, K.; Rademacher, P. Gas Phase Thermolysis of Pyrazolines .5. Electronic Structure and Gas Phase Thermolysis of Tetrazole Derivatives Studied by Photoelectron Spectroscopy. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1997, *34*, 113–122.
- (89) Tassaneeyakul, W.; Birkett, D. J.; McManus, M. E.; Tassaneeyakul, W.; Veronese, M. E.; Andersson, T.; Tukey, R. H.; Miners, J. O. Caffeine Metabolism by Human Hepatic Cytochromes P450: Contributions of 1A2, 2E1 and 3A Isoforms. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1767–1776.
- (90) Kristoffersen, L.; Bugge, a.; Lundanes, E.; Slørdal, L. Simultaneous Determination of Citalopram, Fluoxetine, Paroxetine and Their Metabolites in Plasma and Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *734*, 229–246.
- (91) Carpenter, R. L.; Eger, E. I.; Johnson, B. H.; Unadkat, J. D.; Sheiner, L. B. Pharmacokinetics of Inhaled Anesthetics in Humans: Measurements during and after the Simultaneous Administration of Enflurane, Halothane, Isoflurane, Methoxyflurane, and Nitrous Oxide. *Anesth. Analg.* **1986**, *65*, 575–582.
- (92) Zhang, H.; Stewart, J. T.; Ujhelyi, M. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Pindolol Enantiomers in Human Serum and Urine Using a Reversed-Phase Cellulose-Based Chiral Column. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1995**, *668*, 309–313.
- (93) Fischer, V.; Vickers, A. E. M.; Heitz, F.; Mahadevan, S.; Baldeck, J.-P.; Minery, P.; Tynes, R. The Polymorphic Cytochrome P-4502D6 Is Involved in the and Metabolism of Both 5-Hydroxytryptamine Antagonists, Tropicsetron and Ondansetron. *Drug Metab. Dispos.* **1994**, *22*, 269–274.
- (94) Patel, S. S.; Goa, K. L. Sevoflurane: A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Its Clinical Use in General Anaesthesia. *Drugs* **1996**, *51*, 658–700.
- (95) Kharasch, E. D.; Karol, M. D.; Lanni, C.; Sawchuk, R. Clinical Sevoflurane Metabolism and Disposition. *Anesthesiology* **1995**, *82*, 1369–1378.