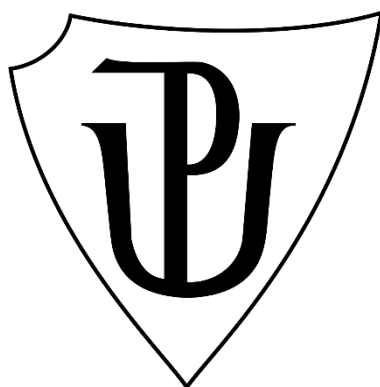


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie



**POROVNÁNÍ PENETRACE VZOROVÝCH LÁTEK PŘES
BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Kateřina Kavková**
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Aplikovaná chemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.**
Rok: 2022

PALACKÝ UNIVERSITY OLMOUC

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry



**COMPARISON OF THE PENETRATION OF SAMPLE
SUBSTANCES ACROSS BIOLOGICAL MEMBRANE**

Bachelor Thesis

Author: **Kateřina Kavková**
Study Programme: B1407 Chemie
Field of study: Applied chemistry
Form of study: Full-time
Supervisor: **doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.**
Year: 2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych moc poděkovat panu doc. RNDr. Karlu Berkovi Ph.D. za rady, odborné komentáře a za vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Storchmannové za odborné konzultace a reakce na dotazy ohledně výpočetních metod a výsledků.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Kavková
Název práce	Porovnání penetrace vzorových látek se přes biologické membrány
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt: Buněčná membrána je tvořena lipidovou dvouvrstvou, která chrání buňku před nechtěnými transporty látek. Transport probíhá na základě pasivního nebo aktivního transportu. Tato práce se věnuje pasivnímu transportu a výpočtem energie tohoto děje na vybraných molekulách léčiv. Výsledky jsou diskutovány a porovnávány mezi sebou.

Klíčová slova	membrána, transport, lipid, COSMOmic
Počet stran	37
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's name	Kateřina Kavková
Title	Comparison of the penetration of sample substances across biological membrane
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract: The cell membrane is made up from a lipid bilayer, that protect the cell from unwanted transport of substances. Transport takes place on the basis of passive or active transport. This work is devoted to passive transport and the energy calculation of this process on selected drug molecules. The results are discussed and compared with each other.

Key words	membrane, transport, lipid, COSMOmic
Number of page	37
Number of appendices	2
Language	Czech

OBSAH

CÍL PRÁCE	1
TEORETICKÁ ČÁST	2
BIOLOGICKÁ MEMBRÁNA	2
SLOŽENÍ MEMBRÁN	2
LIPIDOVÁ MEMBRÁNA	6
POHYBY MEMBRÁNY	7
VLASTNOSTI MEMBRÁNY	7
ROVNOVÁHA	9
TRANSPORT	9
EXO- A ENDOCYTÓZA	9
TRANSPORTNÍ PROTEINY	10
AKTIVNÍ TRANSPORT	10
PASIVNÍ TRANSPORT	10
LÉČIVA	11
ANTIBIOTIKA	11
ANTIPSYCHOTIKA	12
ANTIARYTMIKA	12
DISTRIBUCE LÉČIV V ORGANISMU	12
METODY	13
MODELOVÉ MEMBRÁNY	13
HXD	13
BBB	13
BLM	13
CACO2	13
DOPC	13
DMPC	14
CERAMIDY	14
DATABÁZE	14
MOLMEDB	14
PUBCHEM	15
VÝPOČETNÍ METODY	16
PerMM	16
COSMOmic	16
Postup výpočtu	17
VÝSLEDKY A DISKUZE	18
Vyhodnocení COSMOmic	19
Porovnávání profilů volné energie	19
Porovnání hodnot celkových bariér vůči vodnímu prostředí - ΔG_{diff}	20

Porovnání penetrační bariéry a rozdělovacího koeficientu membrána-voda	22
Porovnání hloubky minima v membráně vůči partičnímu koeficientu membrány a vody	24
Porovnání bariéry proti vodní fázi s rozdělovacím koeficientem membrána-voda	24
Vyhodnocení PerMM	27
Porovnání výsledků PerMM a COSMOmic	28
ZÁVĚR	30
SUMMARY	31
REFERENCE	33
Přílohy	35

CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo vybrat porovnat chování molekul léčiv na membránách. Výběr proběhl na základě dostupných experimentálních dat s omezením na nízkomolekulární látky dostupné v databázi PDB. Následně byly provedeny výpočty jejich chování na modelových membránách, které byly interpretovány a diskutovány.

TEORETICKÁ ČÁST

BIOLOGICKÁ MEMBRÁNA

SLOŽENÍ MEMBRÁN

Membrány tvoří ohraničení všech buněk. Jsou složeny z poloviny z lipidů a z velké části z proteinů. Membrána slouží k oddělení vnějšího prostředí buňky od vnitřního a zabraňuje míchání těchto dvou prostředí. U buněk eukaryotických se nachází i uvnitř a tvoří ohraničení organel od intracelulárního prostředí. Nalezneme je například u mitochondrií, endoplazmatického retikula nebo jádra. Prokaryotické buňky mají pouze plasmatickou membránu¹.

Proteiny jsou druhou nejčastější molekulou v membránách, hned po lipidech. V membránách se vyskytují dva druhy. Jedním jsou periferní proteiny, které jsou pouze na povrchu, buď vnějším, nebo vnitřním. Jsou vázány slabými vazbami a mohou se tak kdykoli odpojit. Druhým typem jsou integrální proteiny. Přecházejí celou membránou přes lipidovou dvojvrstvu. V okolí těchto proteinů působí indukční síly na lipidy a tím je znehybňují. Bílkoviny spolu s lipidy vytvářejí systém s co nejnižší energií. Funkce proteinů jsou zejména transport přes membránu a hrají také důležitou roli při pohyblivosti membrány².

Lipidy jsou v obecném ohledu estery mastných kyselin a alkoholu.

Lipidy membrán jsou zejména glycerolfosfolipidy, deriváty glycerolu esterifikovaného z jedné strany dvěma mastnými kyselinami a z druhé strany kyselinou fosforečnou. Taková molekula se nazývá kyselina fosfatidová. Na kyselinu fosfatidovou se dále esterifikací přes fosfát připojují různé molekuly, které tvoří různé druhy lipidů:

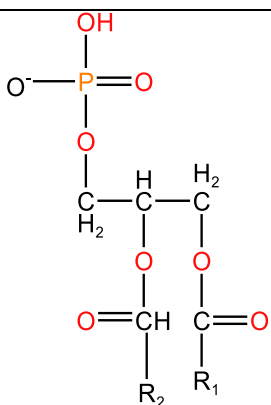
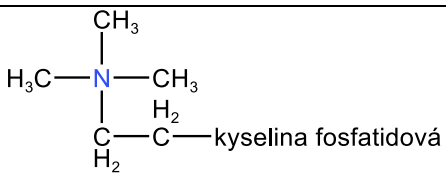
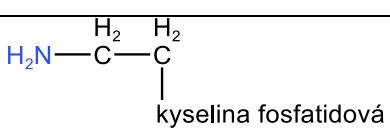
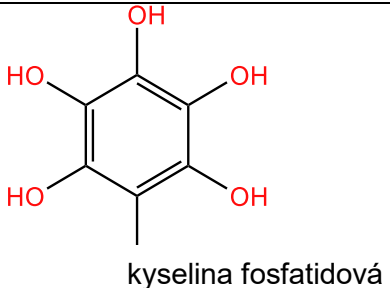
- Fosfatidylcholinu neboli lecitiny vznikají esterifikací cholinu na kyselinu fosfatidovou. Jsou nejčastějšími zástupci fosfolipidů v membráně. Schéma molekuly je zobrazeno na obrázku číslo 1.
- Fosfatidylethanolaminy neboli cefaliny jsou molekuly vzniklé esterifikací kyseliny fosfatidové s ethanolaminem.
- Fosfatidylinositol je esterifikován inositolem na kyselinu fosfatidovou. Je důležitý v případě propustnosti membrán.

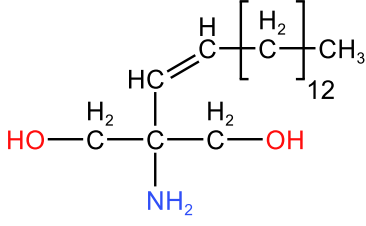
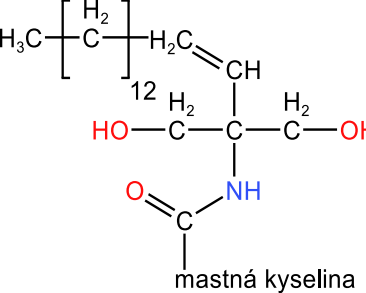
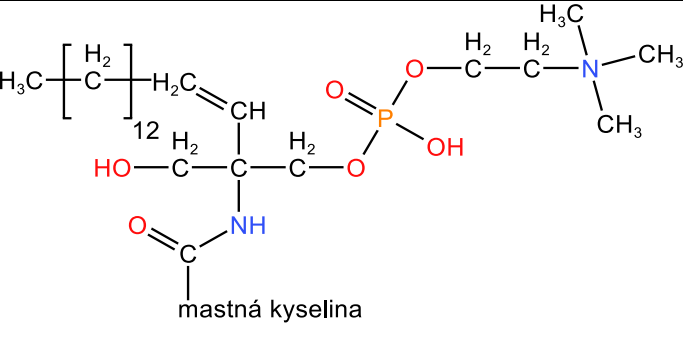
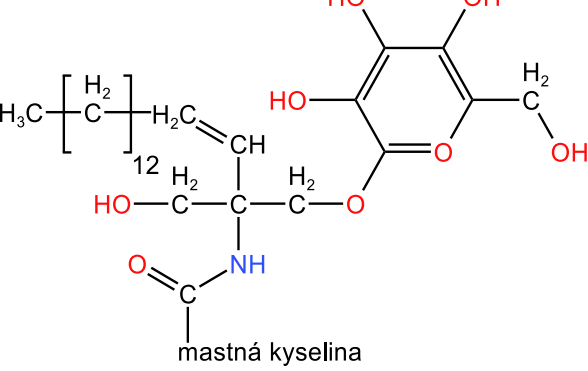
Druhou podskupinu tvoří sfingolipidy. Jsou to odvozené molekuly od sfingosinu. Sfingosin je molekula vzniklá spojením serinu a kyseliny palmitové. Přes dusík je amidovou vazbou navázána mastná kyselina a tím vzniká ceramid. Podle těchto mastných kyselin se sfingolipidy dělí na následující druhy:

- Ceramidy jsou základní struktury, ze kterých vznikají další sfingolipidy. Nacházejí se v mozkové tkáni a hrají klíčovou roli při katabolismu a anabolismu ostatních sfingolipidů.
- Fosfosfingolipidy neboli sfingomyeliny jsou molekuly vzniklé z cerebrosidu na který je esterifikací navázána kyselina fosforečná a přes ni se opět esterifikací váže cholin.
- Glykosfingolipidy opět vycházejí z ceramidu, kde se váže O- glykosidickou vazbou sacharid, nejčastěji jím je hexosa a vzniká molekula cerebrosidu. Cerebrosid je základ pro vznik složitějších glykosfingolipidů. ³

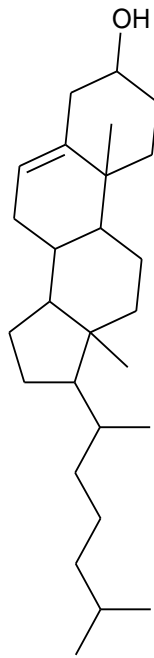
V tabulce č. 1 jsou přehledně uvedeny druhy glykolipidů a sfingolipidů a jak se mezi sebou liší navázáním charakteristických skupin.

Tabulka 1: Přehled glykolipidů a sfingolipidů a princip odvozování jejich zástupců

glykolipidy	
název glykolipidu = kyselina fosfatidová (R ₁ ,R ₂ =mastné kyseliny) + R=polární molekula	
fosfatidylcholin = lecitin	 <p style="text-align: right;">R = cholin</p>
fosfatidylethanolamin = cefalin	 <p style="text-align: right;">R = ethanolamin</p>
fosfatidylinositol	 <p style="text-align: right;">R = inositol</p>

sfingolipidy	
<p>název sfingolipidu = sfingosin + mastná kyselina = ceramid + R</p>	 <p style="text-align: right;">sfingosin</p>
<p>ceramid</p>	 <p style="text-align: center;">mastná kyselina</p>
<p>fosfosfingolipid=sfingomyelin ceramid + zbytek kyseliny fosforečné + cholin</p>	 <p style="text-align: center;">mastná kyselina</p>
<p>cerebrosid (skupina glykosfingolipidů) = ceramid+sacharid (galaktosa/glukoza)</p>	 <p style="text-align: center;">mastná kyselina</p>

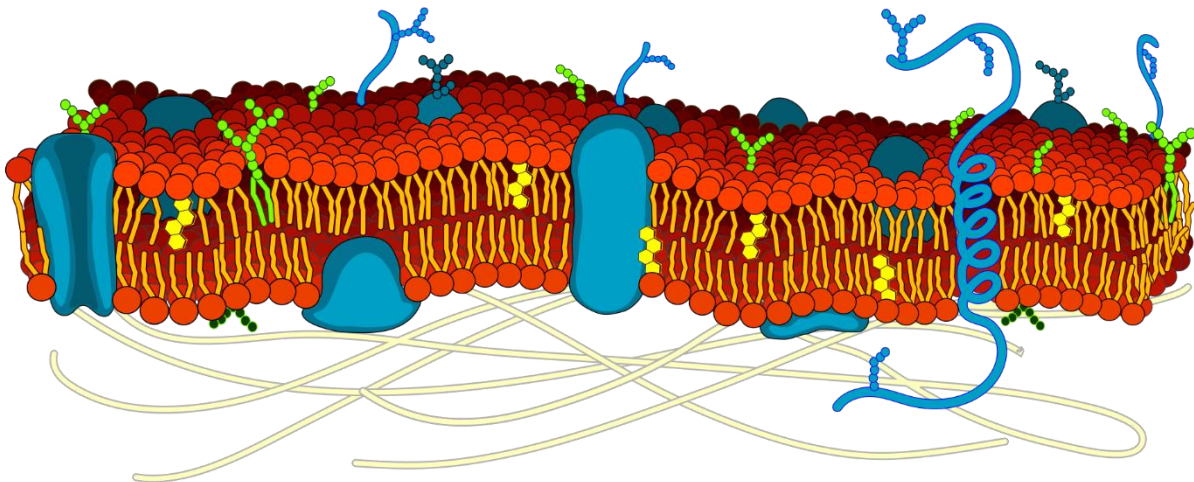
Do poslední skupiny lipidů patří steroly. Příkladem je cholesterol se zcela jinak strukturovanou molekulou (viz Obrázek 1), která se vyskytuje pouze v buňkách živočichů. Díky své odlišné struktuře a alkoholové skupině tvoří slabě amfifilní molekulu a tím ovlivňuje chování celé membrány².



Obrázek 1: Schéma struktury cholesterolu (upraveno a převzato z knihy Horák J.: Biochemie transportních pochodů²)

LIPIDOVÁ MEMBRÁNA

Vzhled všech biologických membrán je podobný. Všechny se skládají z jednotlivých lipidů, které disponují hydrofilní hlavičkou a hydrofobním tělem. Celá molekula lipidu je tedy amfifilní. Pokud je přítomno více molekul lipidů ve vodném prostředí, začnou se dle svých vlastností seřazovat. Hlavičky jsou vždy v kontaktu s vodným prostředím a těla jsou naproti sobě izolována od biologických prostředí. Schématické zobrazení membrány je na obrázku č. 2.



Obrázek 2: Schématické zobrazení buněčné membrány, převzato z

https://www.wikiskripta.eu/w/Architektura_biologick%C3%BDch_membr%C3%A1n

Seskupení do dvojité vrstvy vyžaduje energii, ale výsledná stavba je energeticky méně náročná než vodné prostředí. Polární hlavičky mohou interagovat s vodou za vzniku vodíkových můstků¹ a mezi sebou interagují van der Waalsovými silami. Tyto síly působí indukčním efektem na membránové bílkoviny².

Pro molekuly lipidů je to výhodná pozice, protože tímto uspořádáním mají i nižší energii, než kdyby existovaly samostatně.

POHYBY MEMBRÁNY

Membrána není stacionární struktura. Probíhají v ní neustálé pohyby. První fluidní model mozaiky sestrojili v roce 1972 pánové Singer a Nicolson. Podle jejich teorie se jednotlivé strany chovají jako tekuté krystaly. V membráně se nachází proteiny, které mohou měnit svou polohu a dále se mohou ohýbat a otáček uhlovodíkové řetězce.⁴

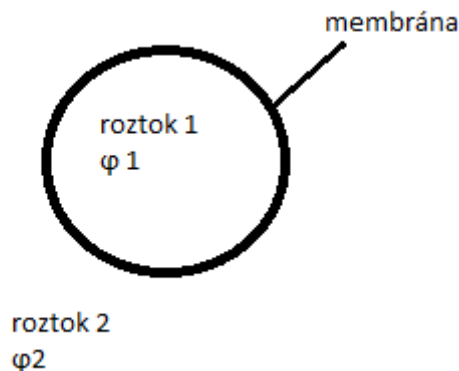
Jednotlivé lipidy mohou v membráně rotovat velmi rychlým pohybem. Tento pohyb se odehrává 10^7 krát za sekundu. Dále mohou v laterálním směru prostupovat membránou, vykonávají difúzní pohyb. Tyto pohyby nejsou moc energeticky náročné, ale mnohem náročnější je, pokud přejde lipid z jedné strany membrány na druhou. Tedy pokud přejde z extracelulární strany na intracelulární. Tento druh pohybu je charakteristický pro růst buněk nebo pro výměnu H^+ iontů na mitochondriálních membránách² a nazývá se flip-flop. Energie musí být vysoká, aby k tomuto pohybu došlo, protože se musí vyměnit polární část z jedné strany do druhé a prochází nepolárním prostředím. Předpoklad pro flip-flop pohyb je pomocí enzymu flip-flopasy⁵.

„Tekutost“ membrány je ovlivněna několika faktory. Prvním je teplota. Při nižších teplotách se části membrány pohybují méně než při teplotách vyšších. Druhým faktorem je přítomnost cholesterolu. Cholesterol je molekula taky amfipatická, ale jeho hydrofobní část je mnohem větší částí než hydrofilní. Mezi lipidy je umístěna v úrovni jejich mastných kyselin a tímto narušuje těsnou blízkost lipidů. Dalšími faktory jsou délka uhlovodíkového řetězce a délka řetězce mastných kyselin. Delší řetězce mají větší tendence se shlukovat a tím více zamrzat než řetězce kratší.⁴

VLASTNOSTI MEMBRÁNY

Nejdůležitější vlastností membrán je propustnost. Jejich základní funkcí je oddělovat dvě kapalná prostředí a pomocí transportérů je čerpat z jednoho prostředí do druhého. Tento typ membrány je semipermeabilní. Tato vlastnost úzce souvisí s rozložením náboje. Za klidové situace existuje na membránách klidových potenciál. V každém vodném prostředí v okolí membrány jsou rozpuštěny jiné ionty. Na jedné straně může být roztok NaCl a na straně druhé mohou být draselné kationty⁶.

Rozdílem dvou fází kolem membrány vzniká membránový potenciál $\Delta\phi_M$.



Obrázek 1: Schématické zobrazení vzniku membránového potenciálu vlivem dvou fází o různých složeních

Membránový potenciál můžeme vyjádřit rovnicí⁷:

$$\Delta\varphi_M = \varphi_2 - \varphi_1 \quad (1)$$

Každý roztok má svůj chemický potenciál μ . Většinou je buňka ve vodném prostředí, standardní chemický potenciál složky bude tedy vždy stejný⁵.

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i + z_i F \varphi \quad (2)$$

μ_i^0 - chemický potenciál složky, R - univerzální plynová konstanta, T - termodynamická teplota, a_i - aktivita, z_i - náboj, F - Faradayova konstanta, φ - elektrický potenciál fáze

Membránový potenciál můžeme také vypočítat pomocí Nernstovy rovnice, ale ta počítá pouze s vstupem jednoho iontu.

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X_0]}{[X_i]} \quad (3)$$

R - univerzální plynová konstanta, T - termodynamická teplota, z - náboj iontu, F - Faradayova konstanta, $[X_0]/[X_i]$ - koncentrace iontu v extracelulárním a intracelulárním prostředí.

Vhodnější je použít Goldmanovu rovnici, protože počítá i s ostatními ionty, které najednou mohou poházet přes membránu.

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_{Na^+}[Na_0^+] + P_{K^+}[K_0^+] + P_{Cl^-}[Cl_i^-]}{P_{Na^+}[Na_i^+] + P_{K^+}[K_i^+] + P_{Cl^-}[Cl_0^-]} \quad (4)$$

R - univerzální plynová konstanta, T - termodynamická teplota, z - náboj iontu, F - Faradayova konstanta, P - relativní propustnost pro iont. Za konstantní teploty dojde k ustanovení rovnováhy.

ROVNOVÁHA

Semipermeabilní membrány jsou propustné pro malé ionty, jejichž koncentrace se na obou stranách vyrovná. Tomuto jevu se říká Donnanova rovnováha. Její tvar je uveden v rovnici číslo 5.

$$x = \frac{(zc_1 + c_2) \cdot c_2}{zc_1 + 2c_2} \quad (5)$$

(1) x – koncentrace makroiontu, c_2 – koncentrace soli, z - náboj

Donnanova rovnováha našla uplatnění pro výpočty osmotického tlaku. Můžou nastat 3 případy výsledku x , kdy:

- $x \approx \frac{1}{2}c_2$, Donnanova rovnováha je zanedbatelná, protože ionty jsou rozděleny rovnoměrně
- $x \approx c_2$, nízkomolekulární iont přejde téměř všechnen na druhou stranu, protože makroiont je v nadbytku
- $c_1 \approx c_2$, koncentrace jsou srovnatelné a část soli přejde do prostoru mezi těmito elektrolyty⁷

TRANSPORT

Membrány v buňce tvoří bariéry, které brání volnému promíchávání roztoků. Některé látky mohou membránou proházet prostou difuzí, např. molekula kyslíku nebo oxidu uhličitého nebo látky rozpustné v tucích. Nabité částice a velké molekuly musí procházet z buňky a ven pomocí transportních mechanismů. Rozlišujeme dva druhy transportu. Aktivní a pasivní, které jsou vykonávány přes transportní proteiny¹.

EXO- A ENDOCYTÓZA

Velké molekuly nebo molekuly, které se nemohou rozpouštět ve vodě, mohou být přeneseny pomocí vezikulů. Mechanismus těchto dvou druhů transportů je stejný a probíhá pouze opačným směrem.

Vezikuly jsou odchlípené části buněčné membrány. Částici obstoupí, uzavřou se a transportují ji ven, v tomto případě se jedná o exocytózu nebo částice se nachází v extracelulárním prostředí a vezikul ji transportuje dovnitř, probíhá endocytóza. Pokud místo částice je transportována tekutina, jedná se o pinocytózu⁶.

TRANSPORTNÍ PROTEINY

Umožňují průchod pouze ve vodě rozpustným molekulám. Jsou v membránách zanořeny mezi lipidy a umožňují přechod pro určitý druh iontu nebo molekuly.

Existují dva typy proteinů. Jedním je přenašečový protein, který změní svou konformaci, naváže molekulu a tu přenesse přes membránu. Druhým typem je kanál, který je dutý a přenáší většinou ionty⁴. Jsou známy kanály stále otevřené, které umožňují transport malých iontů procházejících po koncentračním spádu nebo elektrochemickém gradientu. Další typ kanálu je řízen elektrickým polem. Ty se vlivem elektrického potenciálu na membráně otevírají nebo zavírají. Nejčastěji přenáší sodné a draselné ionty. Speciální typem jsou akvaporiny. Umožňují prostup vody v membránách, které neumožňují transport vody difuzí mezi lipidy. Jsou velmi malé, v průměru 0,2 nm a nemohou tedy transportovat jiný druh molekul⁶.

AKTIVNÍ TRANSPORT

Aktivní transport dále můžeme rozdělit na primární a sekundární.

Primární aktivní transport probíhá za spotřeby energie, kdy molekuly prohází proti elektrochemickému gradientu. Nejznámějším zástupcem je sodno-draselná pumpa. Tento mechanismus spotřebovává 1 molekulu ATP na transport 3 Na⁺ z buňky do extracelulárního prostoru a 2 K⁺ do buňky.

Sekundární aktivní transport využívá symportu a antiportu. Kdy jedna molekula je transportována po spádu, v tomto je to pasivní transport a energie uložená je použita na transport proti spádu. Tomuto typu transportu se také říká kontraport. Buněčná energie ve formě ATP se tedy nespotřebovává přímo, ale je nutné využít primárního transportu, kde je buněčná energie nezbytná⁵.

PASIVNÍ TRANSPORT

Pasivní transport probíhá pouze bez spotřeby energie, a tedy po směru koncentračního gradientu. Jedním z pohybů přes membránu po směru koncentračního gradientu je prostá difúze. Difuzi popisují matematicky Fickovy zákony.

První Fickův zákon:

$$J = -D\nabla c \quad (6)$$

J – hustota toku, D – difúzní koeficient, ∇c – gradient koncentrace

Tento zákon říká, že hustota toku je přímo úměrná zápornému difúznímu koeficientu a koncentračnímu gradientu⁵. Můžeme ho zapsat ještě jiným tvarem:

$$J = -D \left(\frac{ds}{dx} \right) = -D(s_{II} - s_I)/\delta = P(s_I - s_{II}) \quad (7)$$

s – koncentrace látky S , x – vzdálenost od počátku difúzního pochodu, s_I – koncentrace látky na startovní straně membrány, s_{II} – koncentrace látky na cílové straně membrány, δ – tloušťka membrány, P – permeabilitní konstanta

Permeabilitní konstanta se získá z výpočtu pro transport při počáteční rychlosti kdy $s_{II} = 0$. Permeabilitní konstantu můžeme získat také ze dvou veličin. Veličina K neboli rozdělovací koeficient udává míru rozdělení rovnováh mezi roztokem a lipidovými molekulami membrány a veličinu D_m , který charakterizuje vlastní difúzi uvnitř membrány.

$$P = \frac{KD_m}{\delta} \quad (8)$$

Difúzní konstanta může být také vyjádřena z pohyblivosti, která je pro velké molekuly třetí odmocnina molekulové hmotnosti, výraz tedy bude $D_m M_r^{1/3}$ a pro malé molekuly je výraz $D_m M_r^{1/2}$.

Po dosazení tedy získáme vztah $P = kM_r^{-1/2}$ a pro lepší lineární závislost se může dosadit za M_r relativní hmotnost methanolu M_{me} . Lineární závislost je mezi $\log PM_r^{-1/2}$ a $\log K$.

LÉČIVA ANTIBIOTIKA

Antibiotika jsou léčiva, která mají za úkol omezit množení organismů nevhodných pro lidské tělo. Fungují na dvou principech. Prvním typem je baktericidní působení, kdy antibiotikum usmrcuje mikroorganismus narušením buněčné stěny nebo zamezí výstavbě buněčné stěny a dojde k lýze. Druhým typem je bakteriostatický účinek a léčivo se naváže na ribozom a nemůže tak probíhat proteosyntéza nebo znemožní vzniku nukleovým kyselinám. Léčba těmito léčivy by se neměla opakovat, a měly by se složení léčiv měnit, protože mikroorganismy se mohou stát odolnými.

ANTIPSYCHOTIKA

Je skupina léčiv, která řeší problémy s psychickými onemocněními. Psychická nemoc obecně vzniká, když neurotransmitery neváží na svá místa hormony, jako jsou dopamin, serotonin, adrenalin atp. a klesá tak jejich koncentrace. Podle toho, jaké hormony a jak moc je blokují, vznikají psychická onemocnění buď dočasného stavu jako mohou být lehčí deprese až po trvalá poškození nervové soustavy při vzniku Alzheimerovy choroby. Antipsychotika mají mechanismus působení takový, že zablokují receptor, pro nejvíce obsazovaný hormon a musí se vázat hormony, které byly předtím zablokované. Léčba těmito látkami je dlouhodobá a první odezva na medikaci bývá až v řádech týdnů a léčba bývá dlouhodobá a mnohdy i trvalá.

ANTIARYTMIKA

Tato skupina léčiv se využívá k léčbě nepravidelných srdečních stahů nebo preventivně proti tomuto onemocnění. Její mechanismus působení spočívá v blokádě průchodnosti iontů. Blokadí průchodnosti sodíkových iontů dochází ke zpomalování akčního potenciálu. Nebo blokadí vápníkových kanálů, které vedou vzruchy v uzlech⁸.

DISTRIBUCE LÉČIV V ORGANISMU

Po vstupu léčiva do organismu se odehrávají fyziologické změny, které jsou zkoumány na dvou úrovních. O první se zajímá farmakokinetika, kdy je sledován sled od podání léčiva, neboli adsorpce, distribuci-transport léčivé látky, jak léčivo prochází membránami, metabolismus-přeměna léčiv až po eliminaci z organismu. Druhou úrovní je pro farmakodynamiku a ta studuje, jak léčiva na organismus působí⁹.

METODY

MODELOVÉ MEMBRÁNY

HXD

Modelová membrána tvořená dvouvrstvou *n*-hexadekanu je použita k modelování hydrofobní vrstvy.

BBB

Hematoencefalická bariéra neboli BBB (blood brain barrier) jsou buňky mozku, které mají velmi složitou strukturu a vytváří velmi těsné struktury, aby nedocházelo k narušení rovnováhy v centrálním nervovém systému.¹⁰

BLM

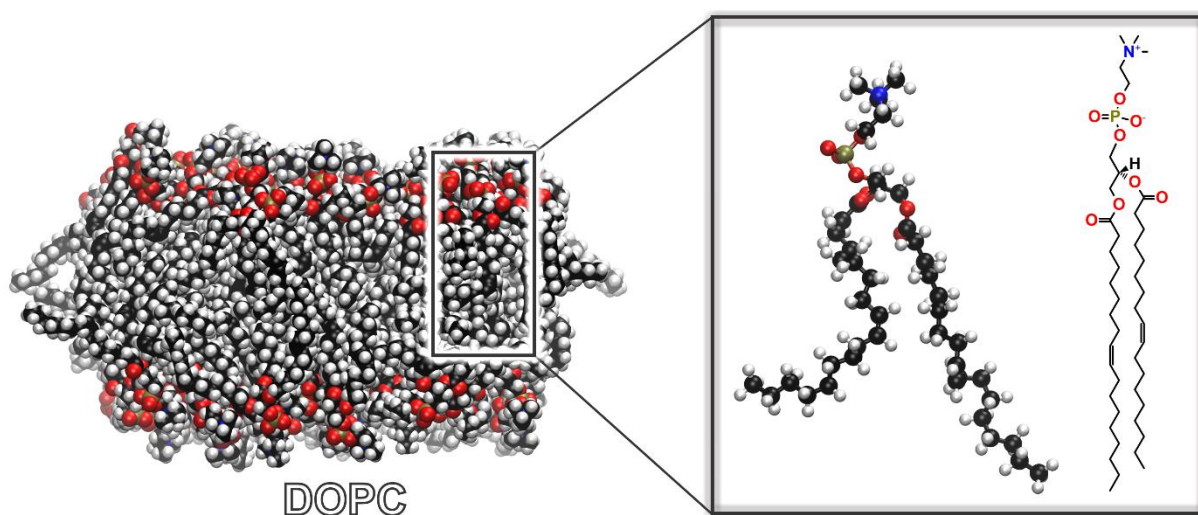
Planární dvojvrstva, která je odděluje dvě vodná prostředí a je velmi labilní strukturou¹¹.

CACO2

Buněčná monovrstva, která se pěstuje na polykarbonátové vrstvě sloužící ve výzkumu léčiv. Její nedostatky mohou omezit transportu lipofilních částic přes membránu¹².

DOPC

Modelová membrána buněk patří do skupiny fosfatidylcholinů a systematický název jednotky této membrány je 1,2-di-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin. Nejčastější výskyt této molekuly je v endoplazmatickém retikulu a plazmatických membránách. Molekula má dva nenasycené řetězce v hydrofobní části molekuly (viz Obrázek 3).



Obrázek 3: Vzhled DOPC membrány, převzato z

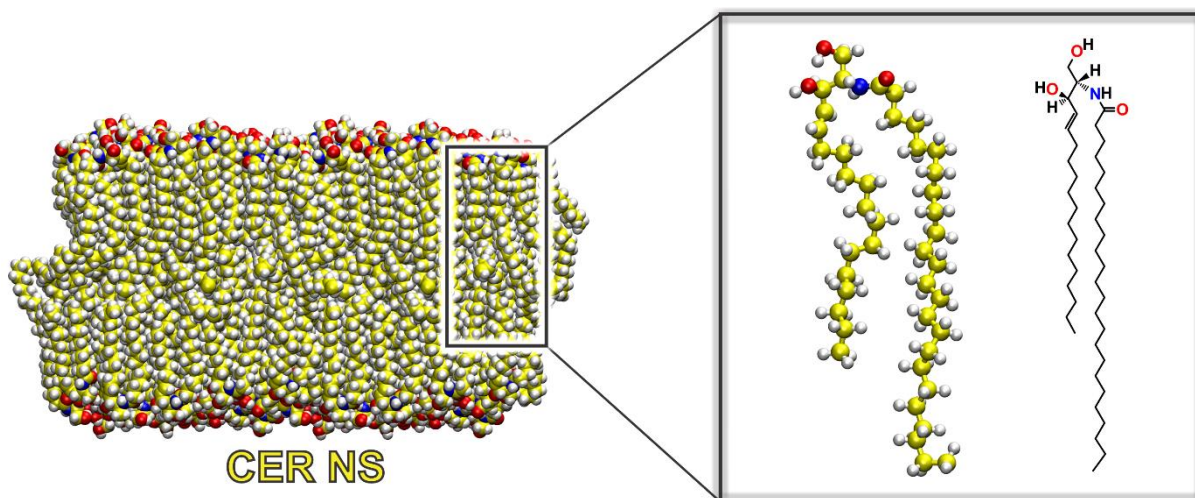
https://molmedb.upol.cz/media/files/pictures/dopc_final1.png (obrázek ze dne 15. 4. 2022)

DMPC

Je modelová membrána buněk, jejíž systematický název 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin. Je nejčastěji obsažena v endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně a liší se od DOPC membrány tím, že má oba uhlovodíkové řetězce nasycené¹³.

CERAMIDY

Modelová membrána kůže, která se skládá z ceramidů označována jako CER NS. Ty jsou obsaženy ve stratum corneum (SC). Slouží jako zjednodušený model pro stratum corneum. Je to uspořádaná membrána (viz Obrázek 4).

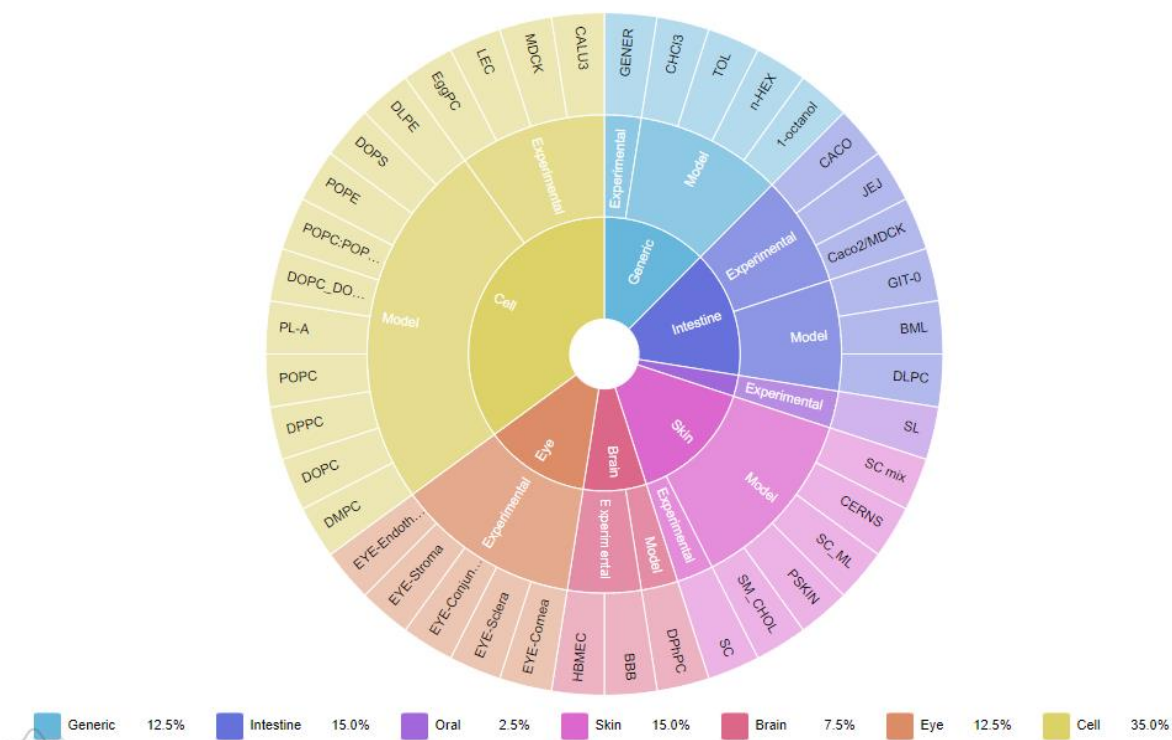


Obrázek 4: Struktura CRN modelové membrány, převzato z https://molmedb.upol.cz/media/files/pictures/cerns_final1.png (obrázek ze dne 15. 4. 2022)

DATABÁZE

MOLMEDB

MolMeDB je databáze molekul interakcí molekul s membránami. Ukládají se v ní informace o jednotlivých molekulách jako je název, systematický nebo triviální, sumární vzorec, identifikátor SMILES, metoda, výsledky z metod a tak podobně. V záložce „browse“, najdeme v přehledných kruzích metody, buňky a transportéry. Každý kruh je ve středu rozdělen na základní okruhy, které se směrem ven více dělí. Kliknutím na vnější část kruhu dojde k přesměrování na základní informace o daném pojmu. Na obrázku č. 5 jsou zobrazeny základní buňky, pro které mohou být výpočty prováděny. Tato databáze se od ostatních liší tím, že nepoužívá k rozdělení pouze logP, ale poskytuje informace také o tom, jaké transportní proteiny a kde se v membráně nachází. Výsledky jsou rozptýleny mezi mnohé jiné databáze, jako je Permm, Drugbank nebo EDETOX¹³.



Obrázek 5: Nabídka membrán, které jsou obsaženy v MolMeDB

PUBCHEM

Pubchem je chemická databáze, která může být kdykoli a kýmkoli rozšířená a je otevřená pro veřejnost. Pro každou molekulu najdeme chemickou a krystalovou strukturu, oficiální název od IUPAC, chemické i fyzikální vlastnosti, použití, prodejce dané látky a tak podobně. Nachází se zde i SMILES a to kanonické i izomerní, což jsou zjednodušené přepisy molekul, které se od sebe liší tím, že kanonické nemají informaci o izotopech a izomerní je mají obsažené spolu s chirálními centry.

VÝPOČETNÍ METODY

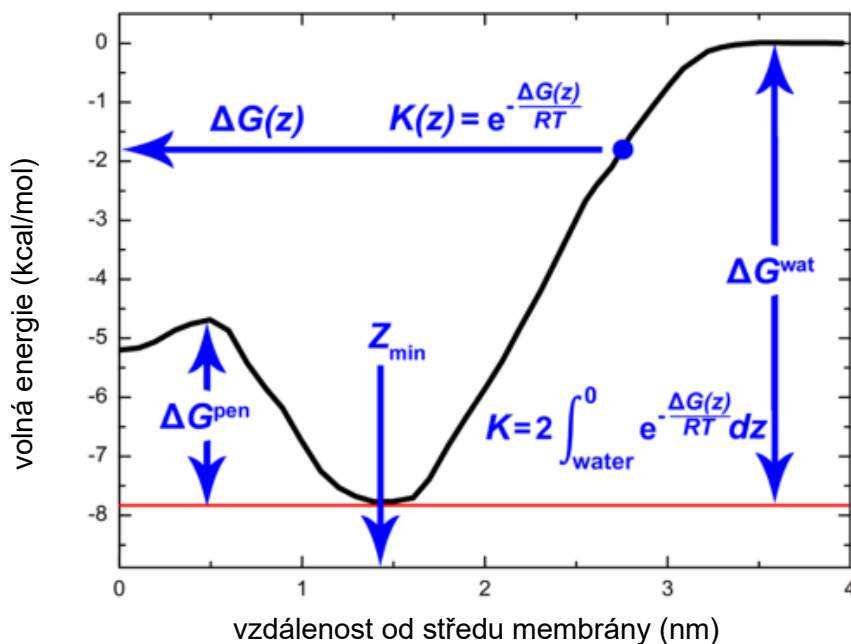
PerMM

Tato metoda vypočítává dva jevy. Prvním je vazebná energie, která je značena ΔG_{bind} a která odpovídá afinitě k membráně. Druhým je energetický profil $\Delta G_{\text{transf}(z)}$, který charakterizuje permeanty v membránách a získaná hodnota je pro prostorovou polohu a konformaci, která nastává při rotačním pohybu u membrány. Metoda pak s pomocí doplnění difúze na základě velikosti a počtu vodíkových vazeb molekuly k prostředí a pomocí implicitního modelu jednotlivých membrán predikuje permeabilitní koeficienty pro neutrální látku $\log P_{0,\text{calc}}$.¹⁴ Metodu můžeme použít ve výzkumu léčiv, kdy dostaneme předpokládaný pasivní transport léčiva přes lipidové membrány. Je dostupná na adrese: <https://permm.phar.umich.edu/server>.

COSMOmic

Systém COSMOmic je počítačový simulační systém, který uvažuje membránu jako tekutý krystal, na rozdíl od jiných metod, které uvažují membránu jako oktanolovou fázi v porovnání s vodnou fází. COSMOmic pracuje zejména s lipozomy, které mají definované složení a teplotu, jež definuje přechod v tekutý stav. Využívá kvantových modelů pro definici solutu a solventu a predikuje vzájemné rozložení a sílu jejich vzájemných mezimolekulových interakcí.¹⁵ Tato metoda se používá pro výpočet partičního koeficientu membrána/voda a zjišťuje jej přes koeficient oktanol/voda, a dále k popisu průběhu profilu volné energie, který může být použit k další práci.¹⁶

Profil volné energie je na obrázku č. 6 vyjádřena v kcal/mol v závislosti na vzdálenosti od středu membrány. Na obrázku se nachází veličina ΔG_{pen} , která představuje volnou energii potřebnou k prostupu léčiva přes bariéru v membráně, Z_{min} je pozicí nejmenší hodnoty volné energie v membráně a ΔG_{wat} je hodnotou hloubky minima volné energie v membráně oproti vodné fázi.¹⁷ Veličina G_{diff} udaná jako rozdíl mezi ΔG_{pen} a ΔG_{wat} odpovídá hodnotě výšky bariéry vůči vodné fázi. $\log K_m$ pak vyjadřuje rozdělovací koeficient membrána/voda a je tedy mírou lipofility molekuly k membráně a je přepočitatelný ze vztahu pro celkový součet volné vazebné energie k membráně G_{bind} podle vzorce $G_{\text{bind}} = -RT \ln K_m$. $\log K_m$ představuje míru afinity molekuly k membráně.



Obrázek 6: Profil volné energie, který se mění v závislosti na průchodu léčiva membránou, převzato z Palonciová M. a kol. ¹⁷

Metoda COSMOmic 18 je složená z 8 podsouborů a jednotlivé podsoubory se spouštěly zvlášť. COSMOperm využívá dat o volné energie ze systému COSMOmic. Oproti metodě COSMOmic počítá metoda COSMOperm i s difuzí na membráně a je tedy schopen přímo spočítat permeabilní koeficient podobně jako metoda PerMM. ¹⁸

Postup výpočtu

Prvním krokem bylo stažení databáze MolMeDB databáze, která má dva hlavní soubory s výpočty pro energetickou bilanci průchodu přes membrány. Prvním je pro aktivní transport a druhá pro pasivní. V této práci je pracováno pouze s pasivním transportem, proto jsem hledala pouze v tomto souboru. Aktuálně se v Excelovém souboru pro pasivní transport nachází více než pět tisíc čtyři sta molekul, pro které se nachází výpočet na modelové membráně. Dostala jsem tři okruhy léčiv: antibiotika, antipsychotika, antimykotika a následně jsem jednotlivé léčivé složky vyhledávala v databázi. Důležité bylo, aby se pro molekulu nenacházel výpočet metodou COSMOmic 18. Našla jsem 102 molekuly, jejichž přehled se nachází v Tabulce č. 2. Pro každé léčivo se následně vyhledávaly SMILES údaje, které se zadávaly do příkazových řádků. Když byly molekuly doplněny o SMILES, musel se soubor „očistit“ od interpunkcí, mezer a neznámých znaků pro výpočetní systém. Připravený soubor se nahrál do clusteru pro výpočet, spolu se souborem obsahujícím metodu. Metoda COSMOmic 18 je složená z 8 podsouborů a jednotlivé podsoubory se spouštěly zvlášť. V průběhu výpočtu COSMOmic jsem prováděla výpočet pomocí metody PerMM. U metody PerMM se soubor s molekulou ve formě .pdb zadával po jedné molekule do řádku webového formuláře.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato část bakalářské práce je věnována interpretaci a zhodnocení výsledků. Byly použity molekuly ze 3 skupin, a to konkrétně antiarytmika, antibiotika a antipsychotika. Přehled molekul je uvedený v tabulce č. 2. Pomocí metody COSMOmic jsem obdržela data na několika membránách a tyto data jsem mezi sebou porovnávala. V tabulce č. 2 jsou shrnuty všechny molekuly, které jsem vyhledala v databázi Pubchem, pro které nebyly napočítány touto metodou v MolMeDB. Následně jsem porovnávala výsledky metody COSMOmic s metodou PerMM.

Tabulka 2: Přehled molekul léčiv, které byly použity pro výpočetní metodu COSMOmic

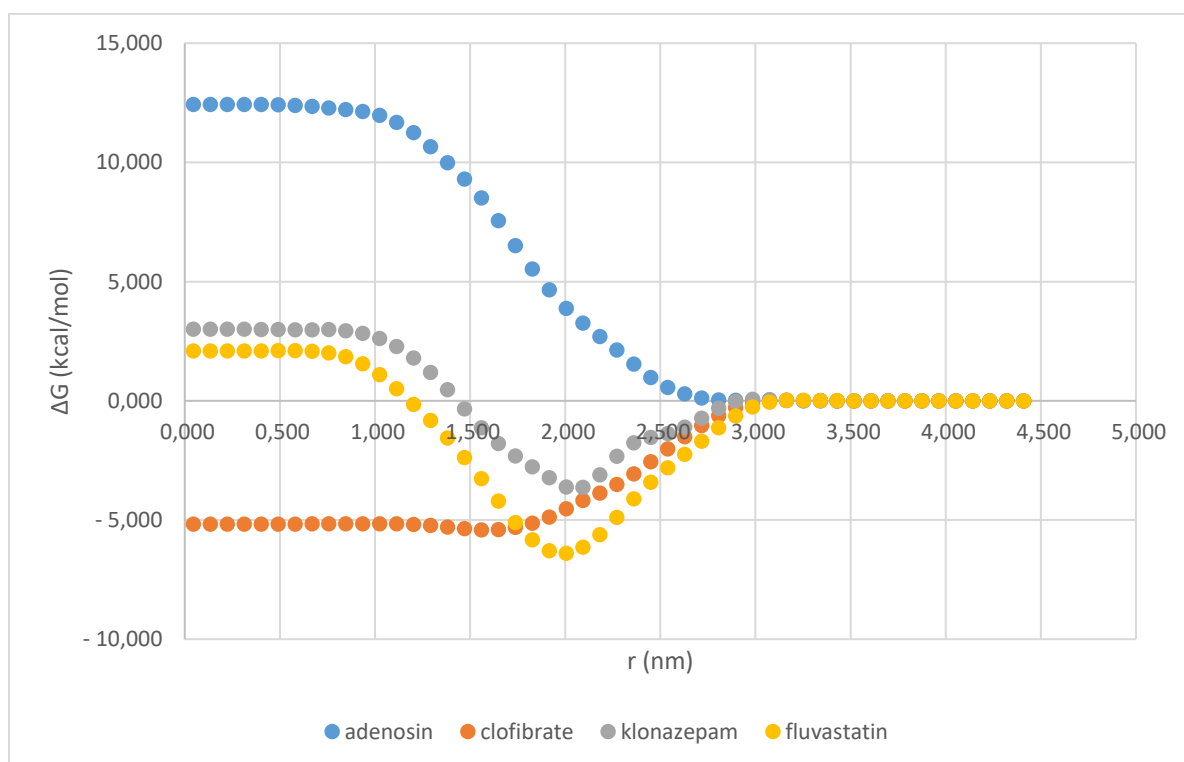
druh léčiva	název léčiva
antibiotika	erythromycin, roxithromycin, clarithromycin, azithromycin, spiramycin, tetracycline, oxytetracycline, rolitetracyklin, chloramfenikol, sulfisoxazole, sulfathizol, sulfasalazin, sulfamethoxazol, lincomycin, klindamycin, dicloxacilin, flucloxacilin, amoxycilin, ampicilin, ticarcilin, piperacilin, peniciline G, cefazolin, cefadroxil, cephalixin, cefuroxim, cefprosil, cefepime, imipenem, meropenem, ertapenem, nitrofurantoin
antiarytmika	chinidin, procainamid, disopryamid, lidokain, trimekain, propafenon, flecainid, amiodaron, sotalol, verapamil, diltiazem, adenosine, mexiletine, phenytoin, moricizin, celiprolol, acebutulol, esmolol, talinolol, nebivolol, bisoprolol, atenolol, carteolol, bopindolol, levobunolol, timolol, sotalol, fenofibrate, clofibrate, bezafibrate, gemfibrosil, ciprofibrate, pravastatin, lovastatin, fluvastatin, simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, cholestiramin, colestipolol
antipsychotika	levetiracetam, fenytoin sodný, gabapentin, pregabalin, clobazam, klonazepam, fenobarbital, primidone, brivaracetam, valproat, topimarát, zonisamid, felbamát, tiagabin, vigabatrin, lacosamid, rufinamid, eslicarbazepin acetát, perampanel, flumazenil, midazolam, flunitrazepam, nitrazepam, flurazepam, zopiclon, levomeprazin, chlorprotixen, dosulepin, hydroxyzin, prometazin

Vyhodnocení COSMOmic

V rámci následujícího textu zpracováváme výsledky z COSMOmic a COSMOperm pro jednotlivé veličiny penetrační bariérou vůči vodě (ΔG_{diff}), penetrační bariérou v membráně (ΔG_{pen}) a rozdělovacím koeficientem membrána-voda ($\log K_m$)

Porovnávání profilů volné energie

Na obrázku č. 7 je znázorněn profil volné energie pro vybrané 4 látky. Adenosin membránou prochází nejpomaleji v hydrofobní části. Naopak nejlépe budou membránou procházet molekula fluvastatinu a klonazepamu. Jejich volné energie se příliš neliší při vstupu ani výstupu z membrány. Pro clofibrate bude nejvyšší rychlost v místě, kde bude vystupovat z membrány,



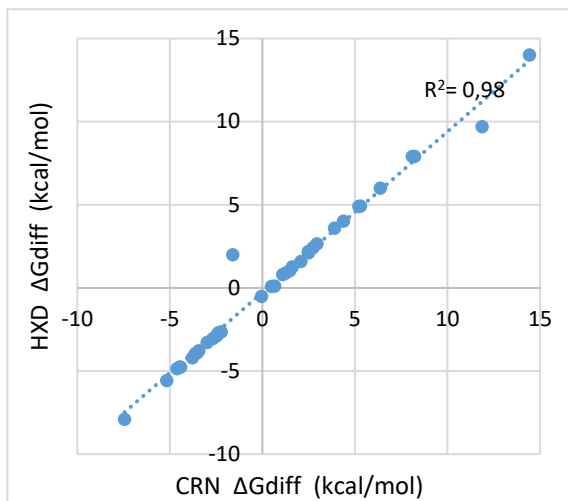
Obrázek 7: Profil volné energie od středu membrány (graf vytvořen v programu Excel)

Porovnání hodnot celkových bariér vůči vodnímu prostředí - ΔG_{diff}

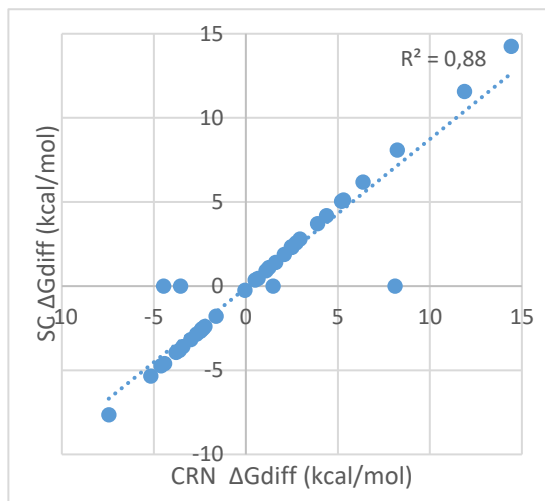
Na obrázku č. 7 jsou grafy vyjadřující vztahy ΔG_{diff} mezi membránami. Výsledky ΔG_{diff} jsou uvedeny v tabulce číslo S1. Tato veličina vyjadřuje hodnotu bariéry, kterou musí molekula překonat při porovnání s vodní fází a tedy, zda molekuly prochází membránou hladce nebo méně efektivně oproti jiným léčivům. Pokud je ΔG_{diff} menší než nula, látka prochází do membrány, protože afinita k membráně je větší než penetrační bariéra uvnitř v membráně, ale látka následně může být v membráně svou afinitou zadržena. Pokud se blíží nule, záleží na molekule, ale pokud nejsou oba extrémy (jak bariéra, tak afinita) příliš velké, tak molekula prochází. V případě, že je ΔG_{diff} větší než nula, bariéra molekule brání membránou z vody procházet.

Nejlépe procházely molekuly kombinací membrán CRN a HXD (graf A). Největší odchylkou v tomto případě je esmolol, který prochází membránami nejméně efektivně a druhou molekulou, která je vychýlená od přímky je adenosine. Ostatní léčiva leží na spojnici. Druhou kombinací membrán je CRN a SC (graf B), kde se léčiva až na 4 výjimky nacházely víceméně na spojnici trendu. Odchýlenými molekulami jsou v pořadí od nejvíce vzdálené po nejméně: colestipol, lidokain, bopindolol, moricizin. Pravděpodobně pro tyto molekuly neproběhly výpočty. První dvě srovnávací membrány prochází velmi podobně a v případě CRN x HXD spolu hodnoty nejvíce korelují. Mnohem méně spolu korelují hodnoty z grafů C, D, kde dochází k tomu, že membrána je mnohem chemicky variabilnější – vysoce polární hlavy a naopak nepolární řetězce – a tak k bariérám přispívají i tyto části, což vede k rozrušení korelace mezi rozdíly bariér vůči vodné fázi. Taktéž si lze povšimnout, že na rozdíl od grafů A a B je směrnice v grafech C a D posunutá o cca 2,5 kcal/mol ve prospěch menších bariér v DOPC a DMPC. Bariéry v DOPC a DMPC jsou pak opět vzájemně podobné.

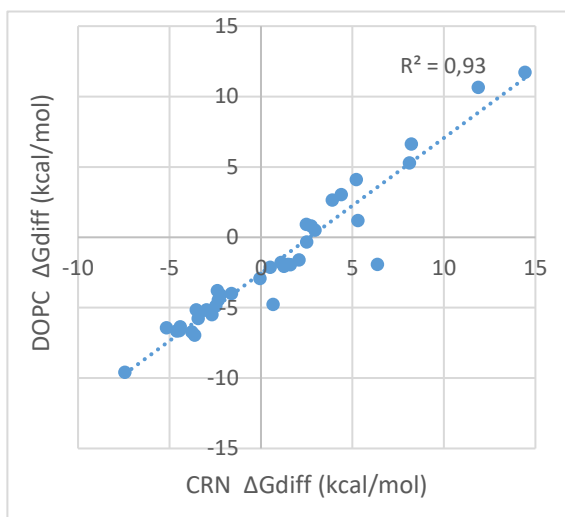
A



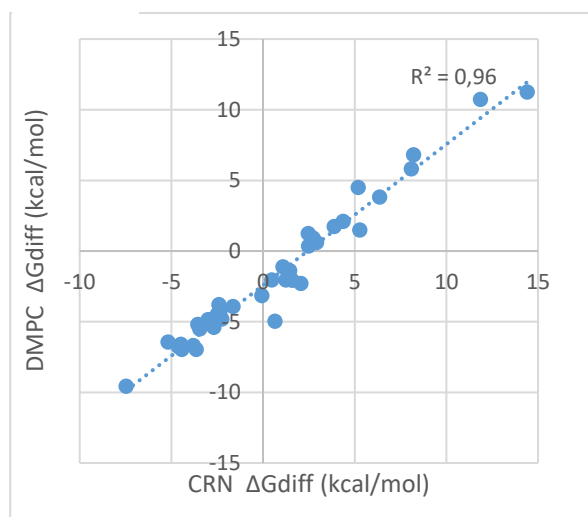
B



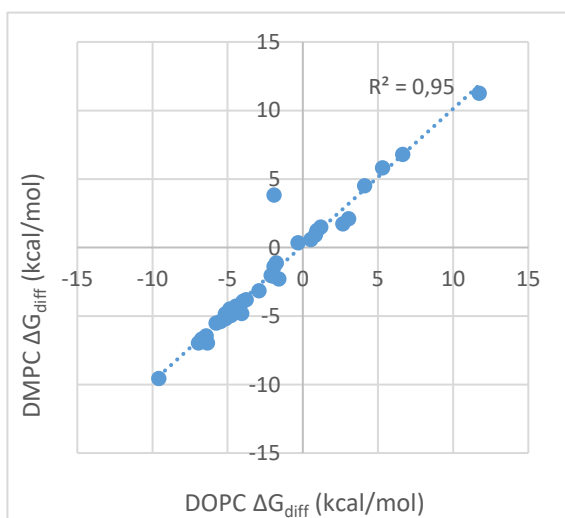
C



D



E



Obrázek 8: Grafy vyjadřující vztahy G_{diff} pěti druhů membrán (grafy vytvořeny v Excelu)

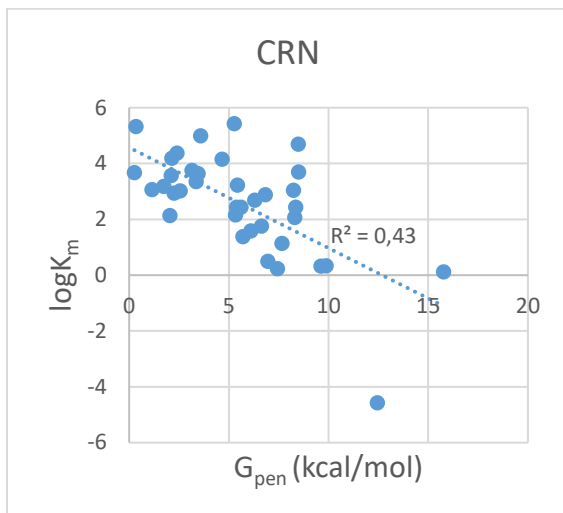
Porovnání penetrační bariéry a rozdělovacího koeficientu membrána-voda

Dále bych chtěla porovnat vztah mezi penetrační bariérou (ΔG_{pen}) a rozdělovacím koeficientem membrána-voda ($\log K_m$). Shrnutím pro všechny membrány je obrázek číslo 8. U všech membrán je patrné, že partiční koeficient nekoreluje s vnitřní bariérou.

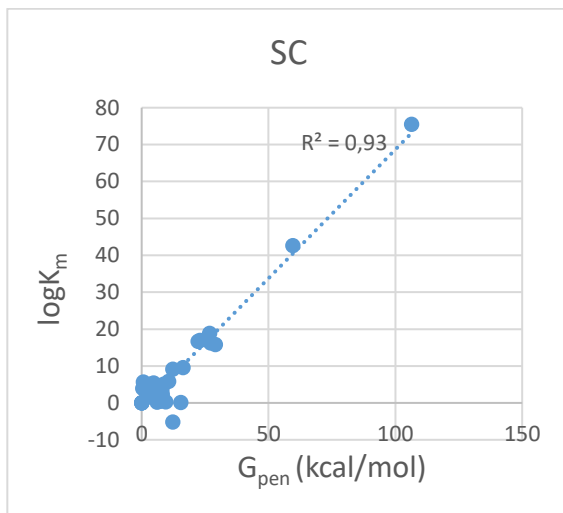
U membrány CRN je v okolí spojnice trendu je velmi různorodá, ale pouze adenosin a amoxicilin se odlišuje od všech molekul a mají velkou hodnotu penetrační bariéry. Amoxicilin má ale téměř nulový koeficient membrána-voda, v případě adenosinu je tento koeficient záporný. V případě membrány SC mají molekuly malou penetrační bariéru i koeficient membrána-voda, ale výrazně se odlišuje flecinid a mexiletine, což vede k matoucí zdánlivě rozumné korelaci, která je ale pouze statistickým artefaktem. Obě tyto léčiva jsou používána k léčbě srdečních arytmií. U membrán HXD, DOPC a DMPC je opět korelace mezi dvěma veličinami malá a podobá se membráně CRN.

U všech membrán je tak patrné, že partiční koeficient nekoreluje s vnitřní bariérou a že tedy jde o dva rozdílné parametry popisující rozdílné interakce látek s membránami – partiční koeficient popisuje jejich afinitu vůči membráně a vnitřní bariéra pak hraje roli ve zpomalování kinetiky přechodu z jedné vrstvy membrány do druhé. To že tyto dvě veličiny vzájemně nekorelují ukazuje na to, že průchodnost látek přes membrány není řízena pouze afinitou, jak by vyplývalo z původních zjednodušujících modelů používající k predikci membránového chování pouze parametry rozdělovacích koeficientů $\log P$.

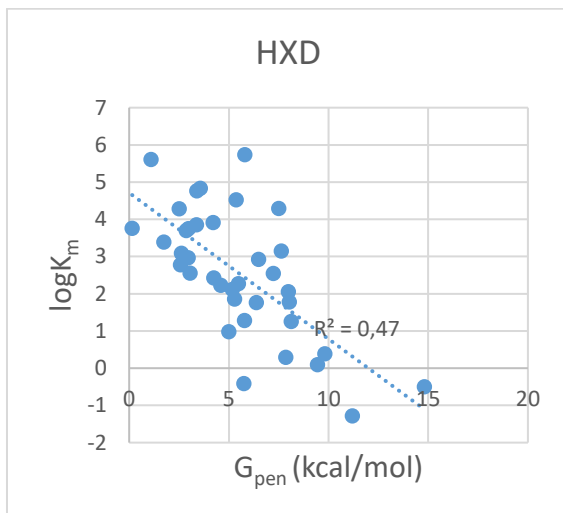
A



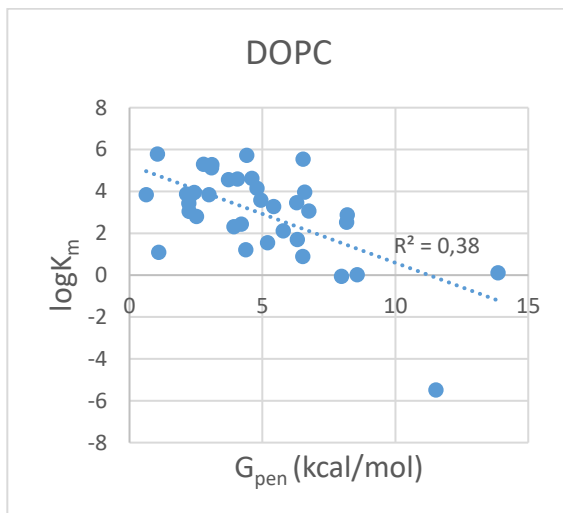
B



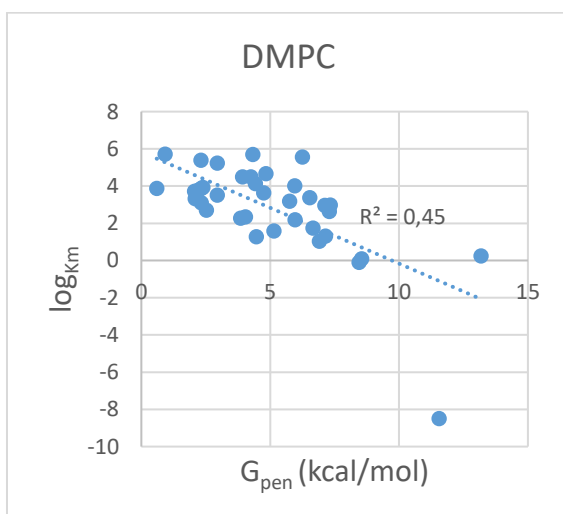
C



D



E



Obrázek 9 Korelace mezi penetrací membránou a partičného koeficientu membrána-voda (grafy vytvořeny v programu Excel)

Porovnání hloubky minima v membráně vůči partičnímu koeficientu membrána a vody

V této podkapitole bych chtěla porovnat partiční koeficient membrána-voda ($\log K_m$) a hloubku minima volné energie v membráně vůči vodné fázi (ΔG_{wat}). Všechny membrány a jejich grafy jsou shrnuty v obrázku č. 10.

U první membrány CRN molekuly korelují a leží tak na spojnici trendu, ale vybočuje pouze adenosin. U druhé membrány SC mají molekuly tendenci postupného trendu, ale colestipolol mají dvě molekuly tak vysokou hodnotu afinity, že opět zcela ruší výpočty. Bohužel to odpovídá tomu, že u SC výpočty nejčastěji padaly a tohle byl i tento případ. U membrány HXD jsou molekuly opět v okolí spojnice trendu, nejvíce se vzdaluje esmolol. Grafy DOPC a DMPC jsou velmi podobné a mimo ostatní hodnoty se nachází opět adenosin, coby nejpolarnější molekula z celého datasetu.

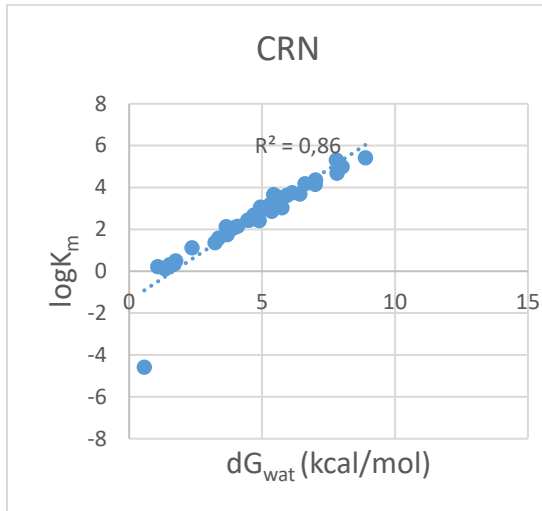
Obecně můžeme shrnout, že rozdělovací koeficient, až na pár výjimek odpovídá hloubce minima volné energie molekuly v membráně a obě veličiny tedy popisují afinitu molekul k membráně.

Porovnání bariéry proti vodní fázi s rozdělovacím koeficientem membrána-voda

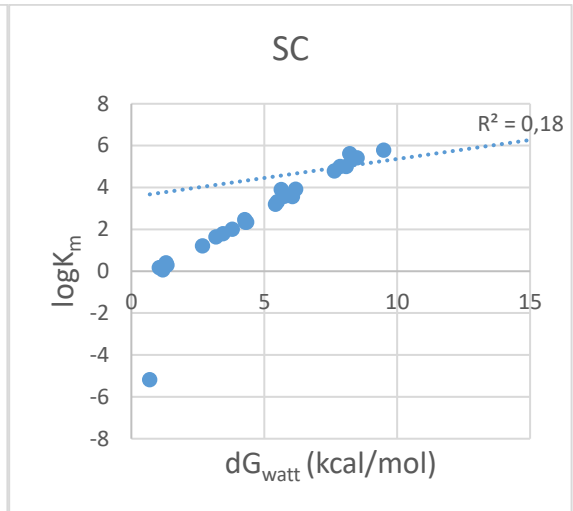
A konečně na obrázku č. 11 jsou uvedeny grafy, které vykazují vztah mezi rozdělovacím koeficientem membrána-voda ($\log K_m$) a energetické bariéry, kterou je nutné překonat vodní fázi, aby mohly molekuly membránou procházet (dG_{diff}). U membrán by se předpokládalo, že bude docházet ke korelaci, a skutečně zde korelaci vidíme. Nejméně spolu souvisí hodnoty u membrány SC, tedy u membrány kůže, ale opět je to dáno několika ustřelenými hodnotami. Tento fakt může mít vliv na porovnání těchto dvou údajů. U membrán DOPC a DPMC byl předpoklad pro přibližnou shodu dvou křivek, ale křivky se mírně odlišují. Blízkou korelací k membráně DPMC vykazovala membrána HXD.

Korelace $\log K_m$ je tedy vůči výšce celkové energetické bariéry oproti vodní fázi zhruba mezi zcela nekorelující bariérou v membráně a hloubkou energetického minima v ní. K parametru hloubky energetického minima má nicméně blíže, než k hodnotě výšky bariéry v membráně.

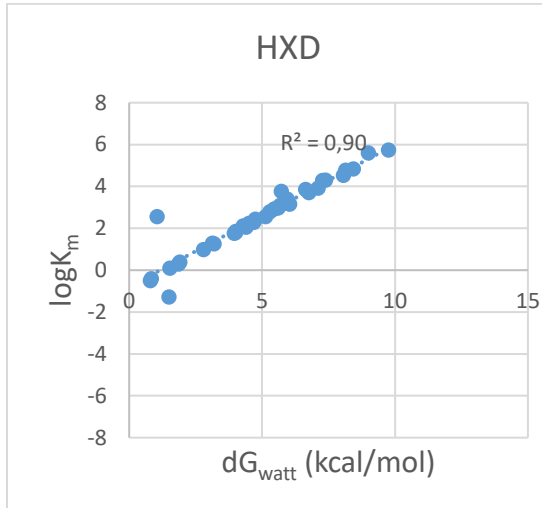
A



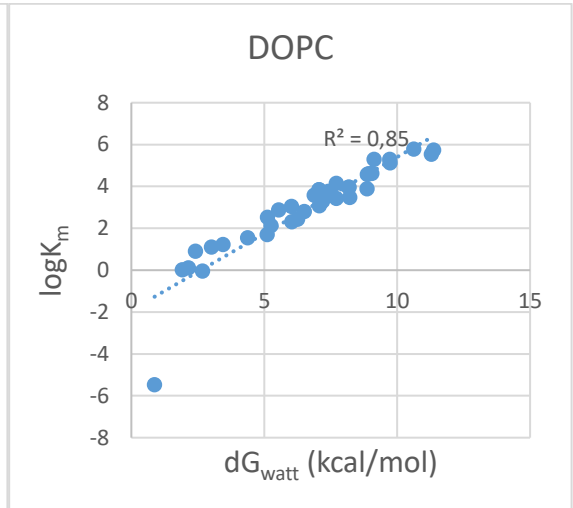
B



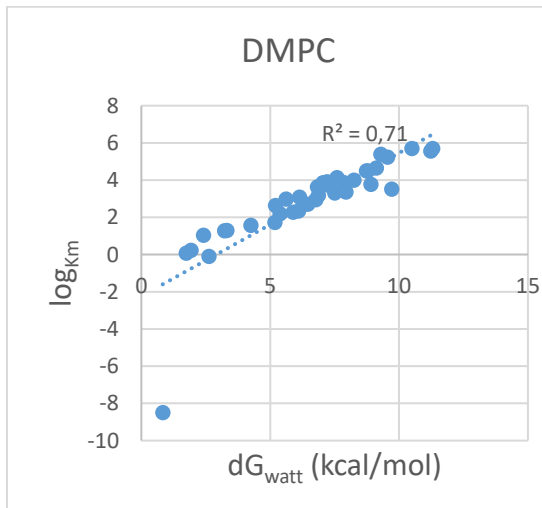
C



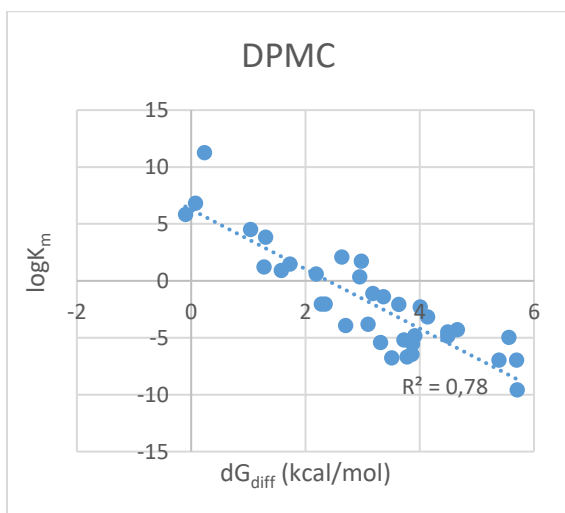
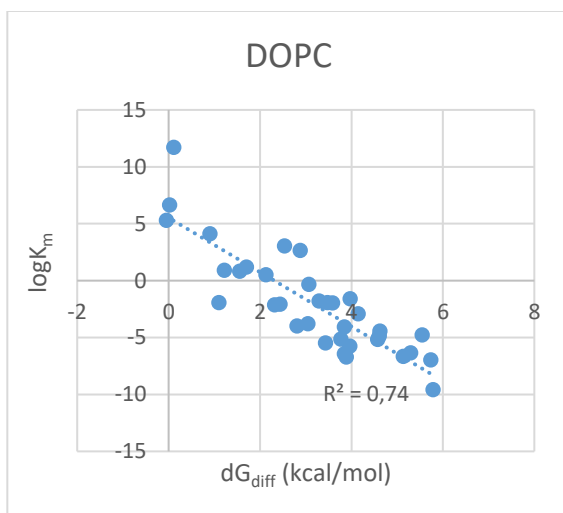
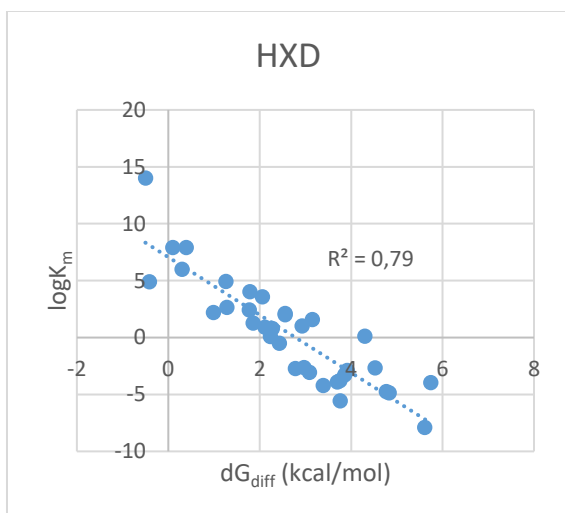
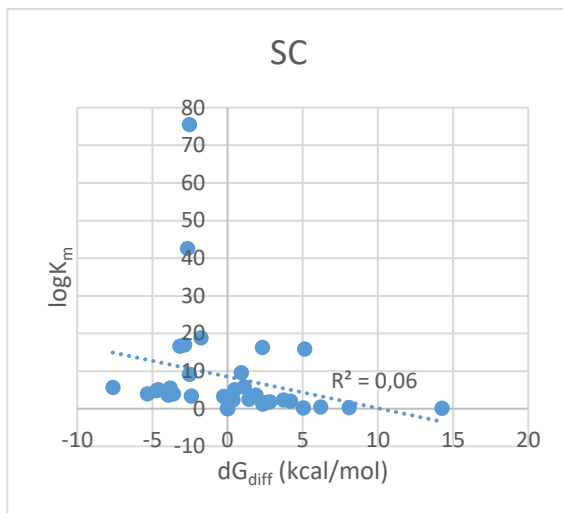
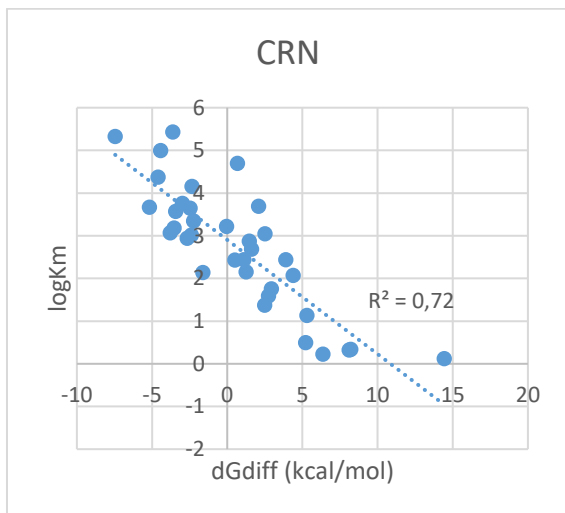
D



E



Obrázek 10: Grafy membrán zobrazující vztah mezi G_{watt} a $\log K_m$ (grafy vytvořeny v programu Excel)



Obrázek 11: Grafické porovnání bariéry proti vodné fázi (dG_{diff}) a rozdělovacímu koeficientu membrána-voda ($\log K_m$), vytvořeno v programu Excel

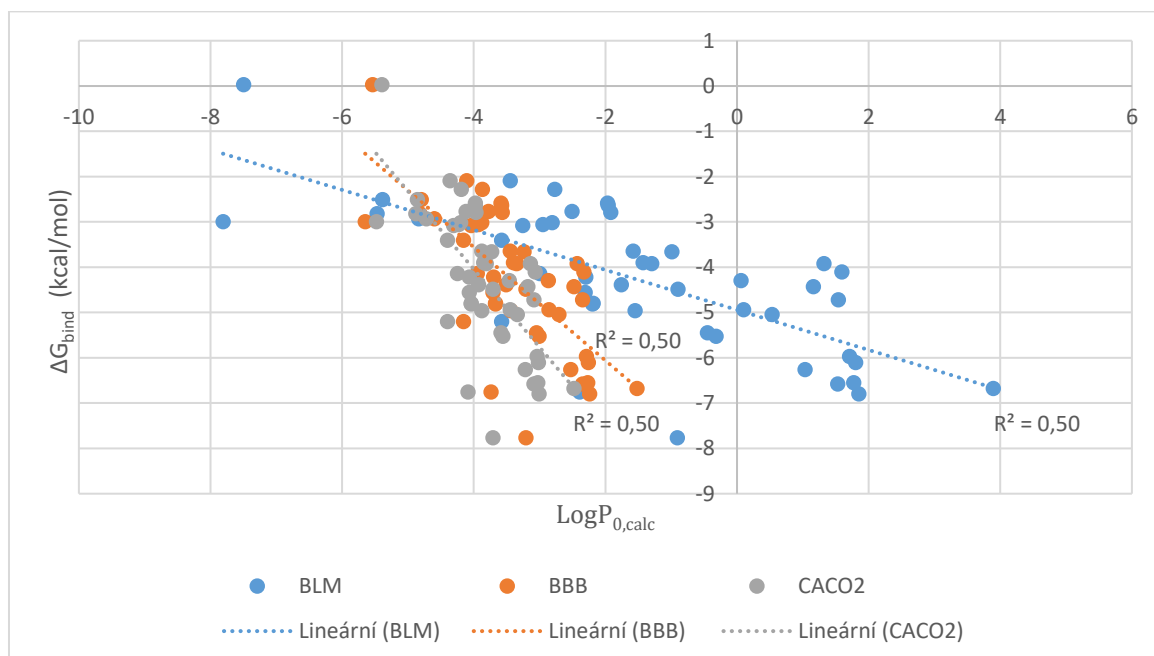
Vyhodnocení PerMM

Výsledné hodnoty, které jsem obdržela výpočty metodou PerMM, jsou uvedeny v tabulce č.S2. Pouze pro molekulu adenosinu výpočet nebyl proveden, i když v databázi PerMM (<https://permm.phar.umich.edu/>) je adenosin uváděn. Vzhledem k tomu, že hodnoty napočítané PerMM serverem se oproti tabelovaným hodnotám systematicky lišily o cca 0,5 jednotky, tak jsme brali v úvahu pouze hodnoty námi napočítané.

Na obrázku číslo 12 je graficky vyjádřen vztah mezi volnou energií afinity k membráně ΔG_{bind} a permeabilitními koeficienty molekul přes membrány – $\log P_{0,\text{calc}}$. Výpočet byl proveden na 3 různých membránách. Ukazuje se, že nejlépe i nejhůře procházejí látky membránou BLM, zatímco přes obě buněčné linie (BBB a CACO2) je predikce permeability vesměs srovnatelná.

Stojí za zmínku, že hodnoty permeačního koeficientu nad -2 v logaritmické jednotce (cm/s) značí látky snadno pronikající membránou, kolem -4 se nachází látky stále pronikající membránou a pod -6 se jedná o látky spíše pasivně nepronikající membránou.

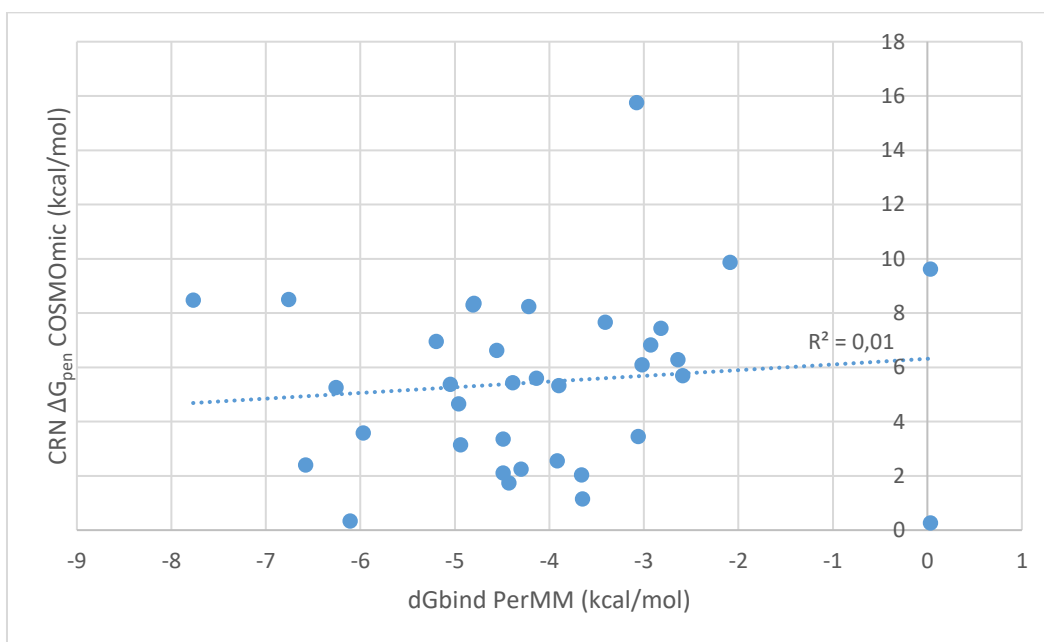
Permeabilita s afinitou ani u jedné membrány příliš nekoreluje. S růstem afinity k membráně (zápornější ΔG_{bind}) látky spíše procházejí, než látky s afinitou nízkou (kladná ΔG_{bind}), ale tento trend zjevně neplatí vždy. Například látka s největší afinitou k membráně (atorvastatin) je o několik řádů pomalejší než cholestiramin.



Obrázek 12: Grafické znázornění energie propustnosti molekul přes membrány BLM, BBB, CACO2 v porovnání s volnou energií PerMM (graf vytvořen v programu Excel)

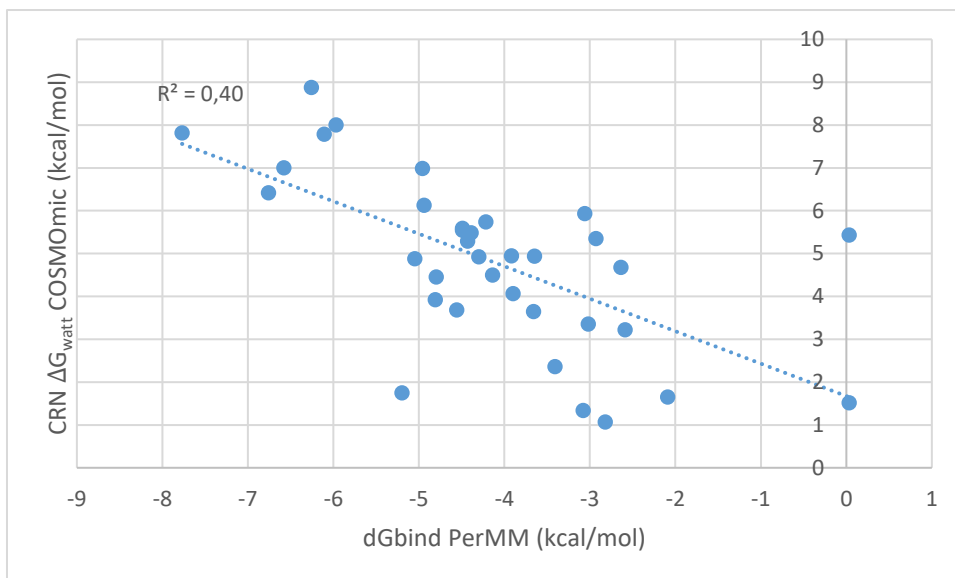
Porovnání výsledků PerMM a COSMOmic

V této podkapitole bych ráda porovnávala výsledky energií mezi oběma metodami. Metoda PerMM nám vypočítala volnou energii dG_{bind} , a tu jsem porovnávala s jednotlivými volnými energiemi z metody COSMOmic. Jak ukazuje obrázek č. 13, tak volná energie dG_{bind} vypočítaná metodou PerMM nekoreluje s volnou energií dG_{pen} z metody COSMOmic. Jelikož všechny membrány mají obdobné grafy závislostí je pro zjednodušení uvedena pouze jedna. Opět se zde tedy potvrzuje, že afinita s výškou bariéry nesouvisí. (viz obrázek č.13).



Obrázek 13: Graf zobrazující vztahy volných energií z obou metod (vytvořeno v programu Excel)

U porovnání volné energie minima v membráně dG_{watt} z COSMOmic a volné energie vyjadřující afinitu k membráně dG_{bind} z PerMM (obr. č. 14). Z důvodu zjednodušení je opět uveden pouze jeden příklad tohoto vztahu, jelikož ostatní situace na membránách jsou obdobné. Volné energie spolu tedy slabě korelují – výrazně lépe než v případě dG_{pen} .



Obrázek 14: Grafické znázornění vztahu ΔG_{watt} a volné energie získané prostupem molekuly membránou metodou PerMM (vytvořeno v programu Excel)

Závěrem bychom mohli shrnout, že porovnáním volných energií dG_{bind} z metody PerMM a ΔG_{pen} , ΔG_{wat} a ΔG_{diff} z metody COSMOmic se ukázalo, že se vypočítané volné energie na tomto souboru látek vzájemně významně liší. Ale jak se dalo očekávat, obě veličiny, které popisují afinitu k membráně (dG_{bind} a ΔG_{wat}) spolu korelovaly více, nicméně ani tak není možné hodnotami PerMM hodnoty výpočetně náročnější metody COSMOmic nahradit.

Nicméně protože permeabilitní koeficienty samy s hodnotami energií příliš nekorelují (a to včetně hodnot z PerMM), ukazuje se nemalý význam difuze pro samotný proces průchodu látky membránou.

ZÁVĚR

Přes buněčné membrány probíhá transport látek, který je řízen energeticky. Buď se energie spotřebovává v rámci aktivního transportu, nebo je využit koncentrační spád, kdy se látky snaží vyrovnat koncentrace. Tento druh transportu je závislý na tom, jak se molekula váže k membráně, jak je molekula afinitní k membráně a jak je membrána lipofilní. Cílem této práce bylo pro set molekul léčiv provést výpočet těchto veličin metodami COSMOmic a PerMM.

Vyhodnocením výsledků bylo dokázáno, že hodnoty ΔG_{diff} , které určují, jakou má molekula bariéru v porovnání s vodou, bylo dosaženo nejlepší shody u výsledků u kombinace CRN a HXD a SC. Jednodušší membrána hexadekanu tedy umožňuje tento parametr u membrán kůže velmi efektivně nahradit a tím ušetřit výpočetní prostředky. Dobré shody dosáhly i membrány DOPC a DMPC, které se také zdají být vzájemně nahraditelné.

Dalším porovnáním hodnoty energie pro bariéru v membráně ΔG_{pen} a partičního koeficientu membrána-voda $\log K_m$ bylo dokázáno, že penetrační bariéra nekoreluje s partičním koeficientem a tudíž průchod látky přes energetickou bariéru uvnitř membrány s afinitou látky k membráně lehce překvapivě nesouvisí. Naopak porovnáním hodnot energie minima molekuly v membráně ΔG_{watt} a partičního koeficientu membrána-voda $\log K_m$ se ukázalo, že tyto výsledky spolu výrazně korelují a afinita k membráně je oběma parametry popsána velice podobně. Vliv hloubky minima je zřejmě silnějším prediktorem pro vybranou sadu léčiv než výška bariéry v membráně, neboť celková bariéra ΔG_{diff} s $\log K_m$ opět korelují.

U metody PerMM se pro prostup od sebe lišily membrány BLM a buněčné membrány CACO2 a BBB. Ukázalo se, že metoda BLM má největší rozptyl hodnot permeace, zatímco obě buněčné linie se vzájemně příliš nelišily. Ukázalo se, že permeabilita s afinitou ani u jedné membrány příliš nekoreluje. Sice platí, že s růstem afinity k membráně látky spíše lépe procházejí než látky s afinitou nízkou. Ale tento trend zjevně neplatí vždy stoprocentně a určitou variabilitu permeability tedy afinita sama postihnout nedokáže.

V případě porovnání metod COSMOmic a PerMM se ukázalo, že hodnoty volných energií vypočítaných oběma metodami spolu překvapivě málo korelují a to i pro afinitu k membráně a nejde je tedy vzájemně nahrazovat.

Shnutím této práce je, že k popisu permeace molekul si s afinitou k membráně vystačíme pouze v hrubých obrysech, ale nikoliv v potřebném detailu.

SUMMARY

The transport of substances across cell membranes is controlled energetically. Either energy is consumed as part of active transport or a concentration gradient is used, where substances try to equilibrate concentrations. This type of transport is dependent on how the molecule binds to the membrane, how affinity the molecule has for the membrane, and how lipophilic the membrane is. The aim of this work was to calculate these quantities for a set of drug molecules using the COSMOmic and PerMM methods.

Evaluation of the results showed that the ΔG_{diff} values, which determine how much barrier a molecule has compared to water, showed the best agreement for the results for the combination of CRN and HXD and SC. Thus, the simpler hexadecane membrane allows this parameter to be replaced very efficiently in skin membranes, thus saving computational resources. Good agreement was also achieved for the DOPC and DMPC membranes are interchangeable.

A further comparison of the energy value for the barrier in the membrane ΔG_{pen} and the membrane-water partition coefficient $\log K_m$ showed that the penetration barrier does not correlate with the partition coefficient and therefore the passage of a substance through the energy barrier inside the membrane is surprisingly unrelated to the affinity of the substance for the membrane. On the contrary, by comparing the values of the energy of the minimum of the molecule in the membrane ΔG_{watt} and the membrane-water partition coefficient $\log K_m$, it was found that these results correlate strongly with each other and the affinity to the membrane is described very similarly by both parameters. The effect of the depth of the minimum is probably a stronger predictor for the selected drug set than the height of the barrier in the membrane, since the total barrier ΔG_{diff} and $\log K_m$ are again correlated.

For the PerMM method, the BLM membranes and the CACO2 and BBB cell membranes differed from each other for permeation. The BLM method appeared to have the largest variance in permeation values, while the two cell lines did not differ much from each other. Permeability was shown not to correlate much with affinity for either membrane. Admittedly, as membrane affinity increases, substances tend to permeate better than substances with low affinity. However, this trend is obviously not always 100% valid and some variability in permeability cannot be accounted for by affinity alone.

In the case of the comparison of the COSMOmic and PerMM methods, it turned out that the values of free energies calculated by both methods correlate surprisingly little with each other, even for membrane affinity, and thus cannot be substituted for each other.

The drawback of this work is that to describe the permeation of molecules, we can only make do with membrane affinity in rough outlines, but not in the necessary detail.

REFERENCE

1. Alberts, B. *Základy buněčné biologie*. vol. 630 (2005). ISBN: 80-902906-2-0
2. Horák, J. *Biochemie transportních pochodů*. (Academia, 1984).ISSN: 1522-1210
3. Matouš, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. (Galén, 2010).ISBN: 978-80-7262-702-8
4. Daniel, M. & Mareš, T. *Biomechanics of biomembranes*. (ČVUT).ISBN: 978-80-01-03915-1
5. Kodíček, M. & Karpenko, V. *Biofyzikální chemie*. (Academia, 2000).ISBN: 80-200-0791-1
6. Trojan, S. *Lékařská fyziologie*. (2008).ISBN: 80-247-0512-5
7. Vodrážka, Z. *Fyzikální chemie pro biologické vědy*. (1982).ISBN: 80-200-0600-4
8. Lincová, D. *Základní a aplikovaná farmakologie*. (Galén, 2002).ISBN: 978-80-7262-373-0
9. Martínková, J. *Farmakologie*. (Grada).ISBN: 978-80-247-4157-4
10. Lingling Xu, Abhijit Nirwane, Y. Y. Basement membrane and blood–brain barrier. *Publ. online* str. 78–82 (2018). 2018 Dec 5
11. H.T. Tien, A. O. Planar Lipid Bilayers (BLMs) and Their Applications. *Membr. Sci. Technol.* **Volume 7**, str. 1–73 (2003).ISBN: 9780444509406
12. I J Hidalgo 1, K M Hillgren, G M Grass, R. T. B. Characterization of the unstirred water layer in Caco-2 cell monolayers using a novel diffusion apparatus. *Pharm Res.* 8(2):222–7. (1991).
13. Juračka J., Šrejber M., Melíková M., Bazgier V., B. K. MolMeDB: Molecules on Membranes Database. Database (Oxford). 2019 Jan 1;2019:baz078. doi: 10.1093/database/baz078. PMID: 31250015; PMCID: PMC6597476.
14. Lomize, A. PerMM: A Web Tool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J Chem Inf Model.* 2019 Jul 22;59(7):3094-3099. doi: 10.1021/acs.jcim.9b00225. Epub 2019 Jul 1. PMID: 31259547; PMCID: PMC6781619.

15. 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. (2008) *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 38, 12148–12157.
16. Jakobtorweihen, S., Zuniga A. Ch., Ingram T., Gerlach T., Keil F. J., S. I. Predicting solute partitioning in lipid bilayers: Free energies and partition coefficients from molecular dynamics simulations and COSMOmic. *The Journal of Chemical Physics*. 141. 045102. 10.1063/1.4890877.
17. Paloncýová M., DeVane R., Murch B, Berka K., O. M. Amphiphilic Drug-Like Molecules Accumulate in a Membrane below the Head Group Region.. *J. Phys. Chem. B* 2014, 118, 4, 1030–1039, *Publication Date: January 13, 2014*
<https://doi.org/10.1021/jp4112052>
18. A. H. Schwöbel, J. *et al.* COSMOperm: Mechanistic Prediction of Passive Membrane Permeability for Neutral Compounds and Ions and Its pH Dependence. *J. Phys. Chem. B* **124**, 3343–3354 (2020).

Přílohy

Tabulka S1: Přehled výsledků Gdiff pro jednotlivé membrány

	CRN	SC	HXD	DOPC	DMPC
molekula	Gdiff	Gdiff	Gdiff	Gdiff	Gdiff
acebutulol	1,093	0,909	0,801	-1,781	-1,118
adenosine	11,868	11,572	9,690	10,655	10,722
atenolol	5,292	5,121	4,929	1,193	1,479
atorvastatin	0,661	0,454	0,115	-4,766	-4,970
bezafibrate	-0,061	-0,255	-0,512	-2,920	-3,172
bisoprolol	-2,993	-3,184	-3,276	-5,157	-4,852
bopindolol	-4,475	-99,000	-4,765	-6,628	-6,613
brivaracetam	2,731	2,570	2,419	0,818	0,905
carteolol	1,255	1,101	0,891	-2,062	-2,057
celiprolol	2,497	2,307	2,108	-0,322	0,345
chinidin	-3,440	-3,602	-3,783	-5,770	-5,519
ciprofibrate	-2,240	-2,406	-2,644	-4,072	-4,821
clobazam	0,491	0,356	0,093	-2,117	-2,042
clofibrate	-5,175	-5,338	-5,573	-6,435	-6,449
colestipol	8,099	-99,000	7,906	5,291	5,817
diltiazem	-3,796	-3,946	-4,212	-6,726	-6,690
disopryamid	-4,612	-4,741	-4,867	-6,653	-6,758
esmolol	-1,618	-1,785	1,997	-3,994	-3,937
fenobarbital	6,362	6,180	5,995	-1,924	3,824
fenofibrate	-7,452	-7,640	-7,903	-9,580	-9,573
fentyoinsodny	3,896	3,718	3,584	2,651	1,724
flecainid	-2,484	-2,676	-2,902	-4,870	-4,486
fluvastatin	2,075	1,889	1,587	-1,595	-2,292
gabapentin	2,471	2,330	2,196	0,921	1,228
gemfibrosil	-4,428	-4,598	-4,760	-6,357	-6,979
klonazepam	2,938	2,791	2,642	0,522	0,587
levetiracetam	8,214	8,080	7,909	6,638	6,801
levobunolol	-2,681	-2,853	-3,053	-5,483	-5,415
lidokain	-3,552	-99,000	-3,909	-5,146	-5,202
lovastatin	-3,626	-3,818	-3,955	-6,958	-6,978
mexiletine	-2,398	-2,544	-2,720	-3,782	-3,808
moricizin	1,468	-99,000	1,026	-1,927	-1,393
nebivolol	-2,342	-2,534	-2,682	-4,446	-4,291
phenytoin	4,373	4,193	4,024	3,034	2,090
Sulfamethoxazol	5,202	5,033	4,906	4,102	4,495
Sulfasalazin	1,606	1,410	1,271	-1,954	-2,086
amoxicilin	14,415	14,250	14,011	11,716	11,248

Tabulka S2: Přehled výsledků vypočítaných metodou PerMM

název molekuly	Afinita k membráně	Vnitřní propustnost membrán (po přepočtu na neutrální látky)		
	dG_{bind} (kcal/mol)	$\log P_{0,\text{calc}}$ BLM	$\log P_{0,\text{calc}}$ BBB	$\log P_{0,\text{calc}}$ CACO2
acetobutol	-4,14	-3,00	-3,95	-4,25
adenosin	Nešlo spočítat			
amiodaron	-6,80	1,85	-2,24	-3,01
atenolol	-3,41	-3,58	-4,16	-4,40
atorvastatin	-7,77	-0,91	-3,21	-3,71
bezafibrate	-4,39	-1,76	-3,51	-3,93
bisoprolol	-4,94	0,10	-2,86	-3,45
brivaracetam	-3,02	-2,81	-3,88	-4,20
carteolol	-3,90	-1,43	-3,40	-3,85
celiprolol	-4,22	-2,30	-3,70	-4,07
ciprofibrate	-5,05	0,53	-2,71	-3,34
clobazam	-4,49	-0,90	-3,21	-3,71
clofibrate	-4,11	1,59	-2,33	-3,07
colestipol	0,03	-7,50	-5,54	-5,40
diltiazem	-3,65	-1,58	-3,45	-3,88
disopryamid	-6,58	1,53	-2,35	-3,09
esmolol	-3,66	-0,99	-3,24	-3,73
fenobarbital	-2,82	-5,47	-4,82	-4,88
fenofibrate	-6,11	1,80	-2,26	-3,02
fenytoin	-4,80	-2,19	-3,67	-4,04
flecainid	-3,06	-2,95	-3,93	-4,23
fluvastatin	-6,76	-2,39	-3,74	-4,09
gabapentin	-2,59	-1,97	-3,59	-3,98
gemfibrosil	-5,97	1,71	-2,29	-3,04
chinidin	-3,92	-1,30	-3,35	-3,81
cholestiramin	-6,68	3,89	-1,52	-2,48
klonazepam	-4,56	-2,31	-3,71	-4,07
levetiracetam	-2,09	-3,45	-4,11	-4,36
levobunolol	-4,30	0,06	-2,87	-3,46
lidokain	-4,43	1,16	-2,48	-3,18
lovastatin	-6,26	1,03	-2,53	-3,22
mexiletine	-3,92	1,32	-2,43	-3,14
moricizin	-2,93	-4,84	-4,60	-4,72
nebivolol	-4,96	-1,55	-3,44	-3,88
phenytoin	-4,81	-2,20	-3,67	-4,04
pravastatin	-5,20	-3,58	-4,16	-4,40
pregabalin	-2,64	-1,96	-3,58	-3,98
primidone	-3,08	-3,26	-4,04	-4,31

procainamid	-2,79	-1,92	-3,57	-3,97
propafenon	-5,45	-0,45	-3,05	-3,59
rosuvastatin	-3,00	-7,81	-5,65	-5,48
simvastatin	-6,55	1,77	-2,27	-3,03
sotalol	-2,77	-2,51	-3,78	-4,12
talinolol	-5,53	-0,32	-3,01	-3,56
timolol	-2,51	-5,39	-4,80	-4,86
trimekain	-4,72	1,54	-2,35	-3,09
verapamil	-2,28	-2,77	-3,87	-4,19

Červeně jsou označeny látky, které nejsou v databázi PerMM, ale všechny výsledky byly znovu spočítány PerMM serverem (<https://permm.phar.umich.edu/server>) a typicky se v rámci 0,5 jednotky se liší od tabelovaných hodnot.