

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



## **Chování léčiv pro dermatologické použití na modelových membránách**

### **Bakalářská práce**

Autor:	Kateřina Storchmannová
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Rok:	2019

**PALACKÝ UNIVERSITY OLMOUC**

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry



**Behaviour of Dermatologically Active Compounds  
on Model Membranes**

**Bachelor Thesis**

Author: Kateřina Storchmannová  
Study Programme: B1407 Chemistry  
Field of Study: Applied Chemistry  
Form of Study: Full-time  
Supervisor: doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.  
Year: 2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 .....

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D. za cenné rady, velkou pomoc a trpělivost při zpracování této práce, ale především děkuji za pomoc při poznávání oboru výpočetní chemie.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Storchmannová
Název práce	Chování léčiv pro dermatologické použití na modelových membránách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Kůže je největším orgánem lidského těla, který plní řadu životně důležitých úkolů. Jedním z nich je tvořit bariéru mezi organismem a okolím. Vlivem onemocnění může být struktura či funkce kůže narušena. Cílem této práce je prostudovat chování vybraných dermatologických léčiv na modelových membránách <i>in silico</i> . Výsledky jsou konfrontovány s očekávaným chováním na skutečné kůži.
Klíčová slova	Modelové membrány, kůže, <i>stratum corneum</i> , atopický ekzém, psoriáza, akné, dermatologická léčiva, COSMOmic
Počet stran	56
Počet příloh	1 CD
Jazyk	Český

## Bibliographical Identification

Author's name	Kateřina Storchmannová
Title	Behaviour of Dermatologically Active Compounds on Model Membranes
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	The skin is the largest body of the human body. Skin performs number of vital tasks such as formation of a barrier between the organism and the environment. Due to some diseases, the structure and function of the skin may be impaired. The aim of this work is to study the behavior of selected dermatological drugs on model membranes in silico. The results are confronted with the expected behavior on real skin.
Keywords	Model membranes, Skin, <i>Stratum Corneum</i> , Atopic Dermatitis, Psoriasis, Acne, Dermatologically active compounds, COSMOmic
Number of pages	56
Number of appendices	1 CD
Language	Czech

# OBSAH

Teoretická část .....	1
1. Kůže jako biologická membrána .....	1
1.1 Stratum Corneum.....	1
1.2 Onemocnění kůže a jejich vliv na <i>stratum corneum</i> .....	7
2. Transport látek biologickou membránou .....	9
2.1 Prostá difuze biologickou membránou .....	10
2.2 Vliv chemických vlastností xenobiotika na transport membránou.....	11
2.3 Transport látky membránou kůže.....	12
3. Metody studia biologických membrán .....	14
3.1. Experimentální metody studia membrán .....	14
3.2. Teoretické metody studia membrán .....	15
4. Dermatologická léčiva.....	17
4.1 Obecné principy lokální terapie v dermatologii.....	17
4.2 Dermatologické enhancery, keratolytika, emolincea a humektanty .....	19
4.3 Kortikosteroidy.....	21
4.4 Inhibitory kalcineurinu .....	22
4.5 Protizánětlivá léčiva .....	23
4.6 Antibiotika, antiinfektiva a antiseptika .....	23
4.7 Retinoidy, jejich analogy a deriváty vitamínu D.....	24
Metody.....	26
5. Literární rešerše .....	26
6. Výpočet chování látek na modelových membránách.....	26
6.1 Výpočet profilu volné energie metodou COSMOmic.....	28
6.2 Parametry výpočtu.....	28
Výsledky .....	31
7. Výsledky literární rešerše léčiv.....	31
8. Výpočet chování léčiv na membránách .....	32
8.1 Výpočet jednotlivých údajů o chování látek na membránách.....	33
8.1.1 Porovnání výsledků na jednotlivých modelových membránách .....	33
8.1.2 Vzájemné vztahy mezi výsledky výpočtu .....	34
8.1.3 Průchod léčiva membránou .....	37
8.1.4 Velikost energetických bariér léčiv při průchodu membránou.....	40
Závěr .....	45
Summary .....	47
Reference .....	49

# TEORETICKÁ ČÁST

V této kapitole bude diskutována kůže, především strukturní a chemické složení nejsvrchnější vrstvy. Dále budou stručně popsána onemocnění ovlivňující strukturu či vlastnosti kůže.

## 1. Kůže jako biologická membrána

Kůže je největším orgánem lidského těla. Má celou řadu nezastupitelných a životně důležitých funkcí – poskytuje nám ochranu před vnějšími vlivy, pomáhá nám s termoregulací, je také velmi důležitá pro imunitní systém a nezbytná pro lidský hmat.

Kůže obsahuje dvě základní části, jsou to dermis (škára) a epidermis (pokožka), které obsahují rozdílné typy buněk. Zatímco epidermis je tvořena zrohovatělými vrstvičkami epitelu – *keratolyty*, dermis se skládá z vazivové tkáně. Často bývá k těmto dvěma částem řazena ještě část třetí zvaná *hypodermis* neboli podkožní vazivo, které se nachází pod škárou a je tvořeno řídkou tkání a tukovými tkání. <sup>1</sup> V následujícím textu se zaměřím především na epidermis, protože se jedná o nejdůležitější část pro popis dále zmíněných dermatologických problémů.

Epidermis je nejsvrchnější část lidské kůže, tedy ta, která je nejvíce v kontaktu s vnějším okolím. S tím souvisí fakt, že při jejím porušení se organismus stává náchylnější k mikrobiální, virové i mykotické infekci. V případě porušení také snadněji ztrácí vodu a stává se suchou, což je negativní pro její kondici. <sup>1</sup> Tloušťka epidermální vrstvy u dospělých jedinců dosahuje asi 50  $\mu\text{m}$  a je silně závislá na lokaci na těle. <sup>1</sup> Epidermis je možné dále dělit na dalších pět vrstev. Patří sem *stratum basale*, *stratum spinosium*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*. Pro tuto práci je nejzajímavější poslední vrstva, která je nejvíce zodpovědná za neprostupnost kůže pro chemikálie – *stratum corneum*. <sup>2</sup>

### 1.1 Stratum Corneum

*Stratum corneum* (SC, vrstva rohová) je ve své podstatě konečným produktem procesu diferenciacie epidermálních buněk. Tato 15  $\mu\text{m}$  silná vrstva je zodpovědná za tvorbu chemické bariéry v kůži (tedy za neprostupnost, nebo ztíženou prostupnost kůže pro chemikálie), k čemuž využívá jak unikátní chemické složení SC, tak i její specifickou strukturu. <sup>3</sup>

#### 1.1.1 Chemické složení SC

SC tvoří ze 75–80 % proteiny, z 5–15 % lipidy, zbylá procenta tvoří ostatní organické látky a voda. Mezi organické látky, které se zde vyskytují, patří také látky ovlivňující poddajnost a vláčnost kůže např. aminokyseliny, močovina nebo laktamy. Proteiny (především  $\alpha$ -keratin a v trochu menším zastoupení  $\beta$ -keratin) jsou lokalizovány především do *korneocytů*. Korneocyty mají na svém povrchu ještě hydrofobní obal zabraňující úniku vody. Ostatní proteiny jsou např. kožní enzymy. Lipidy jsou lokalizovány především v mezibuněčné lipidové matrix, a to v lamelovém uspořádání. Lamely jsou složeny z několika vrstev, přičemž vrstvy jsou vysoce uspořádané (viz kapitola 1.1.2). Lipidová složka je přibližně z poloviny tvořená ceramidy (CER),



čtvrtinu tvoří cholesterol (CHOL) a zbylých 10 % hmotnosti připadá na volné mastné kyseliny (FFA). Zajímavým faktem může být skutečnost, že v těchto lipidových lamelách nejsou přítomny na rozdíl od buněčných membrán žádné fosfolipidy. <sup>4</sup>

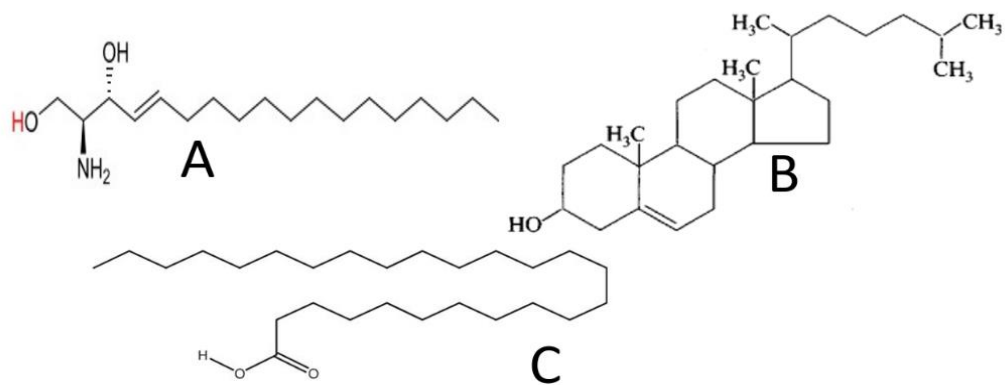
Ceramidy lze považovat za nejdůležitější část lipidů této vrstvy. Skládají se ze zásaditých nenasyčených alkoholů a FFA (viz obrázek 1). Alkoholem je sfingosin či jeho deriváty – fytosfingosinu a 6-hydroxysfingosinu<sup>A</sup>, nejčastější délka uhlíkového skeletu alkoholu je 18 atomů. Sfingosinové deriváty se amidickou vazbou vážou na mastnou kyselinu nejčastěji o délce 24 uhlíků, ale řetězec mastné kyseliny může dosahovat délky od 16 po 38 uhlíkových atomů. Z hlediska délky lze mastné kyseliny v ceramidech rozdělit na dlouhé (obvykle kolem 24 uhlíkových atomů v molekule) a, ultra dlouhé, které mívají řetězec dlouhý 30–32 uhlíků. Mastná kyselina může být substituovaná či nesubstituovaná, jak názorně shrnuje tabulka 1, kde jsou uvedeny strukturální varianty ceramidů. <sup>5</sup>

**Tabulka 1:** Schématické znázornění možných chemických složení ceramidů (ve sloupcích jsou uvedeny možnosti sfingoidní báze a v řádcích FFA)

(vytvořeno dle Ref van Smeden et al. <sup>5</sup>)

	<i>Mastné kyseliny [N]</i>	<i>Alfa-hydroxy mastné kyseliny [A]</i>	<i>Esterifikované omega mastné kyseliny [EO]</i>
<i>Dihydrosfingosin [dS]</i>	[NdS]	[AdS]	[EOdS]
<i>Sfingosin [S]</i>	[NS]	[AS]	[EOS]
<i>Fytosfingosin [P]</i>	[NP]	[AP]	[EOP]
<i>6-Hydroxysfingosin [H]</i>	[NH]	[AH]	[EOH]

<sup>A</sup>V řádu posledních let byly postupně objeveny v rámci výzkumu ceramidů tetrahydroxylované sfingosiny, které nejsou zatím příliš prozkoumány, a proto budou v rámci této práce vynechány. <sup>6</sup>



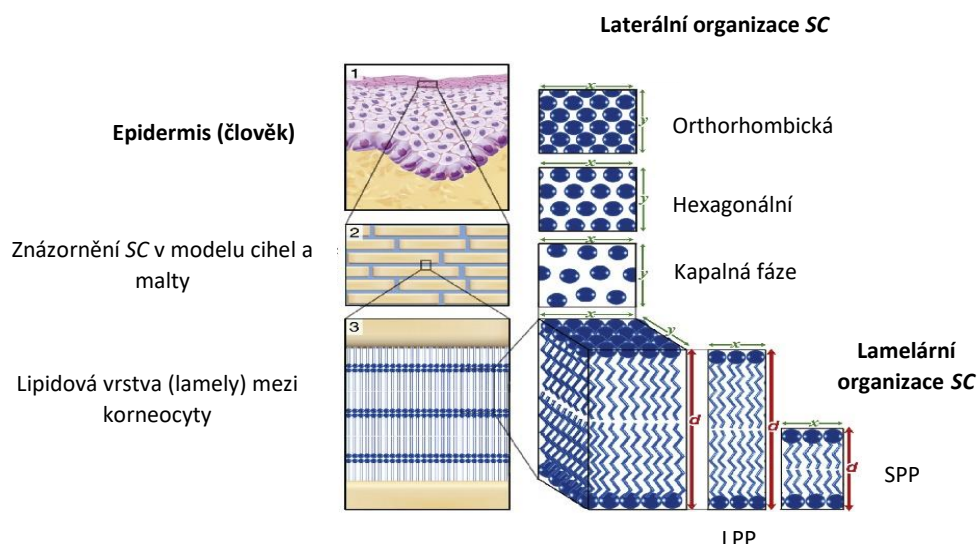
**Obrázek 1:** Vybrané složky SC: A – sfingosin, B – cholesterol, C- kyselina hexakosanoiková

Je rovněž zajímavé, že CER s fytosfingosinem se vyskytují pouze v lidské tkáni, přičemž 6 hydroxysfingosin je typický pouze pro epidermis. Tím se odlišují od CER obsahující sfingosin či dihydrosfingosin, které jsou v eukaryotních buňkách i jiných druhů.<sup>6</sup>

Díky svému chemickému složení a způsobu jakým jsou jednotlivé molekuly uspořádány, dostáváme SC jako neobyčejně nepropustnou a chemicky i fyzikálně odolnou biologickou membránu. Navíc poruchy lipidové matrix jsou důležité pro studium některých kožních onemocnění (viz podkapitola 4.2).

### 1.1.2 Struktura SC

Spodní vrstva SC je vysoce kompaktní, zatímco horní vrstva se postupně odlupuje a stává se součástí ochranného kyselého filmu (pH ~ 5),<sup>2</sup> který se nachází až na samém povrchu lidské kůže<sup>7</sup>. Pro popis struktury SC se velice často používá analogie cihel a malty (angl. „*bricks and mortar*“). Přičemž pomyslnými cihlami v tomto případě jsou ve vodě extrémně nerozpustné a chemicky odolné buňky *kerneocyty* a maltou je *lipidová matrix*.<sup>4</sup> Podrobněji strukturní uspořádání SC v lidské kůži demonstruje obrázek 2, který znázorňuje laterální i lamelární organizaci SC.



**Obrázek 2:** model struktury lidského *strata cornea* (upraveno a převzato z Ref. van Smeden et al. <sup>5</sup>)

Pro neprostupnost *SC* je důležité, že lipidová matrix je tvořena několika vrstvami lipidů nad sebou, které jsou uspořádány do lamel v tzv. lamelární organizaci lipidové matrix. Experimentálně byly na zdravé kůži pozorovány dvě koexistující fáze, které jsou charakteristické rozdílnými opakujícími se vzdálenostmi mezi jednotlivými vrstvami na řezu lamelami v lipidové matrix. Nazývají se dlouhá periodická fáze (LPP; „long periodicity phase“) a krátká periodická fáze (SPP; angl. „short periodicity phase“) a opakující se vzdálenosti jsou pro LPP typicky 11,9 – 13,1 nm a pro SPP jen 5,3 – 6,5 nm. Zajímavé je, že cholesterol může kromě působení ve směsích v LPP nebo SPP také tvořit oddělené domény v lipidové matrix s opakující se vzdáleností 3,4 nm.

Lipidy v konkrétním lamelárním uspořádání mohou vykazovat také různá uspořádání laterální (tj. v rovině membrány). Vedle orthorhombické organizace existují ještě rozvolněnější hexagonální uspořádání a uspořádání kapalná fáze (angl. „liquid phase“). Ve zdravé kůži převažuje orthorhombické uspořádání, přičemž hexagonální lamely mají nižší hustotu a kapalná fáze už vykazuje značnou neuspořádanost. <sup>5</sup>

### 1.1.3 Modely *SC*

V této podkapitole bych ráda zmínila některé novější poznatky a modely *SC*, jelikož přesné uspořádání a role některých složek jsou nadále předmětem výzkumu. Rovněž bych zde ráda představila některé studie provedené s modelovými membránami, které se snaží objasnit roli či uspořádání základních sloučenin tvořící *SC* (zejména CER) a jeho typické vlastnosti.

V minulosti bylo definováno již množství modelů, které se snažily popsat strukturu *SC* např.: *stacked monolayer model*, <sup>8</sup> *sandwich model*, <sup>9</sup> *domain mosaic model* či *single gel phase model*.<sup>10</sup>

Nejstarším modelem *SC*, který bych zde ráda podrobněji zmínila tzv. *Armature reinforcement model*. Kiselev et al. ve svém experimentu studoval konformace

CER[AP]. Molekuly CER jsou v konformaci „fully extended“ (FE), která jak bylo zjištěno je zásadní pro existenci stabilní struktury lipidové matrix SC. Nicméně jak je vidět na obrázku v matici SC se vyskytují i CER v konformaci „hairpin“ nebo také zvané „one sided“ (OS). Z obrázku 3 je také patrné, že preferované uspořádání je závislé na přítomnosti vody v systému. <sup>11,12</sup>

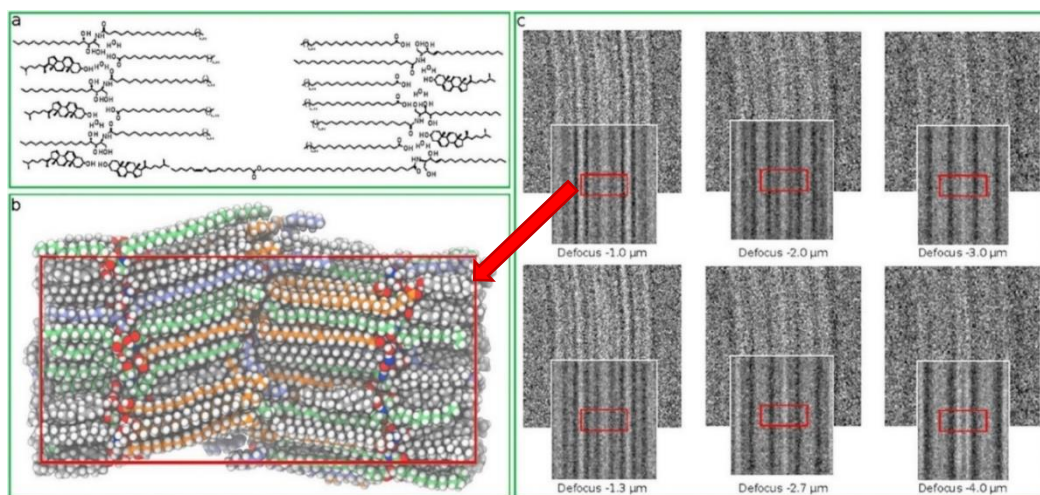


**Obrázek 3:** *Armature reinforcement model* a znázornění změny uspořádání vlivem hydratace:

a) částečně dehydratované SC; b) plně hydratované SC (převzato z Ref. Kiselev et al. <sup>13</sup>)

Iwai et al. představil tzv. *splayed bilayer model*. Tento model pro lipidy ve SC uspořádání ve vrstvách, které jsou navrstvené na sebe (viz obrázek 4). Mezi jednotlivými vrstvami jsou na obrázku pozorovatelné při vysokém rozlišení tmavé pruhy, jak znázorňuje obrázek 4 c. Vzniká tak periodický vzor s opakující se asymetrickou jednotkou. Červený čtverec na obrázku 4 znázorňuje asymetrickou jednotku. <sup>14</sup>

Z hlediska uspořádání stavebních molekul tvořící SC, bylo pozorováno, že CHOL se v tomto modelu vyskytuje u sfingosinového konce CER a FFA u konce mastné kyseliny, který je součástí molekuly CER. Navíc ceramidy jsou v konformaci „fully extended“. <sup>14</sup> Na tento model navázal Lundborg et al. v práci zabývající se zkoumáním bariérové funkce SC pomocí kombinace kryoelektronové mikroskopie a molekulové dynamiky. Výsledky této práce ukazují obrázek 4b, kde potvrzují *splayed bilayer model*. <sup>15</sup>



**Obrázek 4:** Znárodnění *splayed bilayer modelu* a) grafický nákras modelu b) Schéma z molekulárně dynamické simulace, kde atomy uhlíku jsou v nákrasu znázorněny v CER (zelená), ve FFA (oranžová) a v CHOL (šedá). Ostatní atomy jsou zvýrazněny dle typu, o jaký se jedná: kyslík (červená), dusík (modrá), vodík (bílá). c) snímky znázorňující strukturu studovaného systému z elektronového mikroskopu a simulace elektronového mikroskopu. (převzato a upraveno z Ref. Lundborg et al. <sup>15</sup>)

#### 1.1.4 Bariérová funkce SC a její ovlivnění

Budeme-li se zamýšlet nad možnostmi, kde a jak může cizorodá látka, kterou může být v tomto případě i dermatologické léčivo, proniknout přes SC dále do těla. Připadá v úvahu hned několik cest. Jsou to průniky potními a mazovými žlázami, transfolikulární, transcelulární a intercelulární. <sup>4,16</sup>

V případě potních či mazových žláz stejně tak jako v případě transfolikulárním je průnik pro typické dermatologické léčivo velmi obtížný a jeho význam je okrajovějšího charakteru.

Transcelulární průnik je realizován přes korneocyty a je také poměrně náročný. Nicméně uvažíme-li chemické složení korneocytů, které se skládají z proteinů, a tedy řadu karboxylových, hydroxylových skupin a aminoskupin, je možné transport podpořit větším množstvím vody, které způsobí bobtnání korneocytů a snížení viskozity lipidové složky.

Intercelulární průnik je průnikem přes lipidové lamely. Tento způsob vychází ze znalosti molekulární podstaty lipidové matice SC, kdy se využívá tzv. akcelerantů transdermální permeace, což jsou sloučeniny, které působí přímo na lipidy této vrstvy a umožňují tak průnik látek. <sup>4</sup>

Výše uvedený popis struktury SC nabízí pohled na tuto membránu jako na hydrofobní bariéru z hlediska přístupujících látek. Nabízí se tedy otázka, jaké vlastnosti léčivo musí mít, aby bylo schopno dosáhnout požadovaného cíle? Nejdříve je nutné si uvědomit, že svoji roli hraje rozhodně i momentální kondice kůže a její typ, nicméně léčivo musí mít odpovídající lipofilitu a velikost (viz. kapitola 2). Léčivo je složeno nejen z léčivé látky, ale tvoří ho také další pomocné složky, jejíž vlastnosti hrají také důležitou roli (viz. kapitola 4). <sup>16</sup>

## 1.2 Onemocnění kůže a jejich vliv na *stratum corneum*

V této práci se zaměřím na nejběžnější onemocnění lidské kůže. Konkrétně se bude jednat o atopický ekzém<sup>B</sup>, psoriázu (*psoriasis vulgaris*) neboli lupénku a akné (*acne vulgaris*). V této podkapitole budou velmi stručně uvedeny projevy jednotlivých onemocnění a dále bude nastíněno, jakým způsobem ovlivňuje atopický ekzém a lupénka chemické složení a bariérovou funkci SC.

### 1.2.1 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida (AD) je svědivé zánětlivé chronické onemocnění kůže.<sup>17</sup> Toto onemocnění je typicky multifaktoriální a vyskytující se u pacientů napříč věkovými skupinami.<sup>18</sup> Onemocnění se projevuje zánětem, suchostí a svědivostí kůže.<sup>19</sup> AD je rovněž provázena snížením bariérové funkce kůže. To má za následek snížení hydratace, zhoršení obnovy kůže i vyšší náchylnost k infekcím. Z těchto důvodů se léčiva používaná při tomto onemocnění snaží potlačovat některé z výše uvedených problémů atopické kůže a obnovovat původní funkční kůži (viz kapitola 4).<sup>19</sup>

Atopická kůže vykazuje výrazně nižší množství ceramidů [EOS], pokles byl pozorován rovněž u složek [EOP], [EOH], [EOdS], zatímco ceramidy [NS], [AS] a [AP] se ukazují být více zastoupeny. Dále bylo experimentálními studiemi zjištěno, že při onemocnění AD dochází ke zkrácení acylového řetězce ceramidů, toto zkrácení vede ke zvýšení ztráty vody z epidermis tzv. TEWL (transepidermal water loss). V případě volných mastných kyselin s uhlíkovým řetězcem delším než 24 atomů se ukazuje, že jejich množství je v atopickém SC nižší, zatímco FFA obsahující konkrétně 16 a 18 atomů uhlíku vykazovaly nárůst množství.<sup>5</sup> Kromě změn v kompozici lipidové matrix vlivem AD, dochází také ke změnám organizace lipidů SC. Přesněji vykazuje kratší lamelární periodicitu. Nicméně podobně jako zdravá kůže vykazují orthorombickou laterální organizaci. [7]

### 1.2.2 Psoriáza (*psoriasis vulgaris*)

Psoriáza neboli lupénka je chronické zánětlivé onemocnění postihující přibližně 2 % populace západní civilizace. Psoriáza jako onemocnění se projevuje velmi výrazně abnormální proliferací kožních buněk. Onemocnění nicméně ovlivňuje také složení lipidové matrice, a to se projevuje velmi výrazným snížením bariérových vlastností SC a zvýšením ztráty vody i přes výrazně tlustší kůži.<sup>5</sup>

Experimentálně bylo podobně jako u AD byla u psoriázy pozorována změna v ceramidové složce SC, přesněji byl pozorován úbytek ceramidů [EOP], [NP] a [AP]. Naopak by pozorován nárůst ceramidů [AS] a [NS]. Z hlediska lipidové organizace je stejně jako u AD pozorována i u psoriázy kratší lamelární periodicitu.<sup>7</sup>

---

<sup>B</sup> Pro pojem atopický ekzém se mnohdy používá také termín atopická dermatitida. Tyto pojmy jsou v současnosti považovány za synonyma<sup>19</sup>. Z tohoto důvodu budou zaměňovány i v textu této práce.

### 1.3.3 Akné (*acne vulgaris*)

Jedná se o chronické neinfekční androgen-dependentní onemocnění, které se velmi často nachází na obličeji, ale může být přítomno i na jiných částech těla, nicméně je obecně vzato je vázáno na místa s hojnějším výskytem mazových žláz, tyto žlázy produkují více mazu vlivem nadprodukce androgenů a díky nadměrnému rohovatění ve vývodech těchto žláz dochází ke tvorbě tzv. *komedomů*. Tyto komedomy jsou rizikové pro přemnožení bakterií *Propionibacterium acnes*, které vedou k dalším komplikacím.<sup>20,21</sup>

Pokud chceme studovat odchylky kůže pacienta s akné od zdravé kůže, pak velmi výrazné pro tuto práci najdeme ve zvýšené produkci mazu v mazových žlázách. Zde je totiž odlišné složení lipidové složky, než jaké najdeme ve zdravém *SC*. Největší podíl mají triacylglyceroly, které mohou tvořit až polovinu z celkového obsahu. Triacylglyceroly jsou následované estery vosků, skvalenem, volnými mastnými kyselinami a estery cholesterolu.<sup>22</sup>

I v případě akné podobně jako v předchozím případě dochází k odchylkám ve složení ceramidové složky *SC*, tato změna se týká především vyššího poklesu ceramidu [EOS].

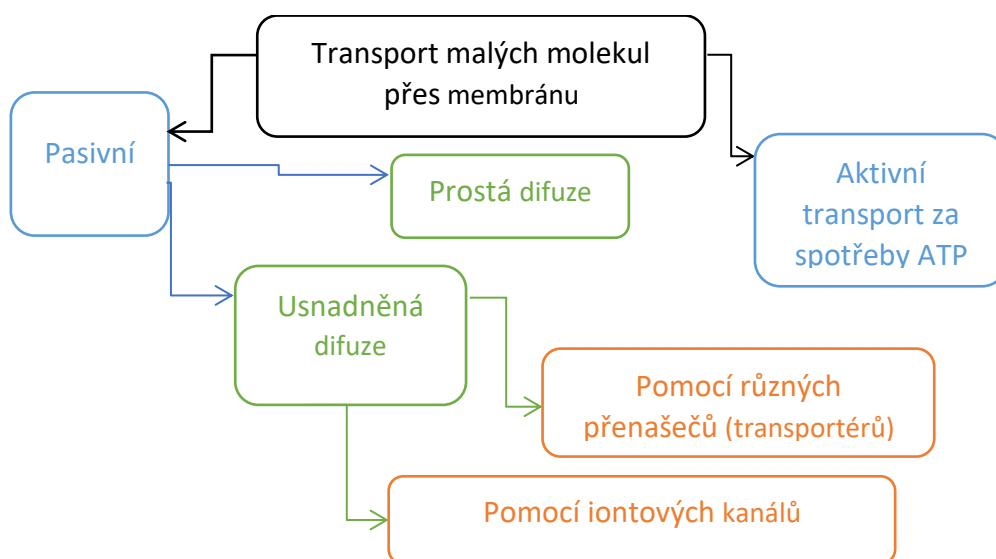
## 2. Transport látek biologickou membránou

V následující kapitole budou nejdříve stručně popsána permeabilita membrány pro různé skupiny látek, poté budou stručně uvedeny známé možnosti transportu látky přes membránu, přičemž největší pozornost bude věnována pasivní difuzi. Následně bude rozvedena role chemických vlastností pro průchod látky membránou a na závěr budou uvedeny možnosti průchodu látky membránou *SC*.

Rozlišujeme celkem pět různých způsobů transportu látek přes biologickou membránu: a) vstup iontovými kanály; b) spřažený transport; c) aktivní transport; d) endocytóza a exocytóza; e) prostá difuze.

- Přestup iontovými kanály je realizován pomocí kanálu v proteinu naplněného vodným roztokem. Tímto kanálem mohou procházet pouze molekuly příslušných rozměrů a vlastností.<sup>23</sup>
- Spřažený transport umožňuje transport i větších molekul. [9] Je realizován pomocí transportního systému buňky, který je sice pasivní, ale zároveň je realizován s jiným systémem, který spotřebovává energii.
- Za aktivní transport považujeme takový přenos, který je realizován, proti směru koncentračního gradientu soustavy. Takovému transportu je třeba dodat energii.
- Procesy endocytóza a exocytóza se navzájem liší pouze směrem, kterým transport probíhá. Oba dva procesy jsou realizovány pomocí jakýchsi transportních váčků. Endocytóza a exocytóza jsou transportními mechanismy pro velké molekuly.<sup>24</sup>
- Poslední možností transportu látky biologickou membránou je pasivní difuze.<sup>23</sup> Tento způsob transportu bude velmi důležitý pro následující text této práce.

Využívané možnosti transportu pro malé molekuly shrnuje obrázek 5.

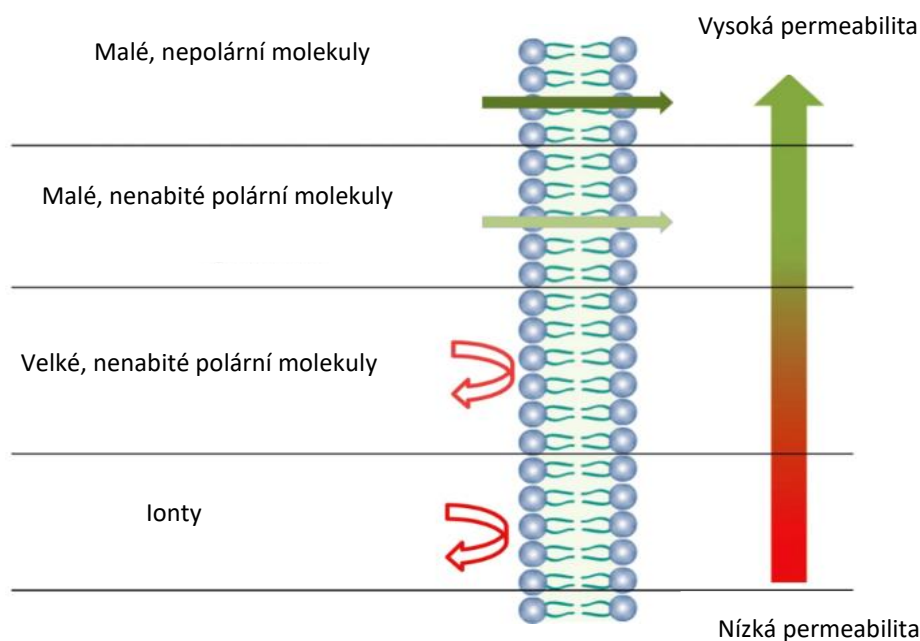


**Obrázek 5:** Schéma možností transportu malých molekul biologickou membránou (vytvořeno dle Ref.<sup>24</sup>)



## 2.1 Prostá difuze biologickou membránou

Difuze biologickou membránou je proces pronikání látek membránou do buňky, přičemž tento proces silně souvisí se semipermeabilitou membrány (viz obrázek 6). Z toho také vyplývá, jaké látky budou difuzí do intracelulárního prostoru transportovány. Obecně lze říci, že se jedná o transportní mechanismus, jakým se přes membránu dostávají malé molekuly. Difuzi lze dále dělit na pasivní a usnadněnou difuzi.<sup>25</sup>



**Obrázek 6:** Pasivní permeabilita biologické membrány pro jednotlivé skupiny látek

(upraveno a převzato z <https://mrrittner.weebly.com/unit-3-the-cell.html>

ze dne 20.4. 2019)

Difuze probíhá ve směru elektrochemického spádu. To znamená, že na rozdíl od aktivního transportu je to proces probíhající spontánně a směrem ke stavu rovnováhy.<sup>25</sup>

Budeme-li chtít nalézt nejjednodušší model, který by popisoval difuzi biologickou membránou, můžeme vyjít ze znalostí klasické fyziky, kde je jev difuze popsán prvním Fickovým zákonem. Tento zákon popisuje difuzi rovnicí 1., kde  $J$  označuje difuzní tok,  $D$  difuzní koeficient,  $\nabla c$  je koncentrační gradient,  $\mathbf{r}$  poziční vektor a  $t$  čas.<sup>25</sup>

$$J = -D\nabla c(\mathbf{r}, t) \quad (1)$$

Tato rovnice platí pro ideální směsi. Ukazuje, že difuze bude probíhat z místa o vyšší koncentraci do místa o koncentraci nižší. V jednodimenzionální představě lze obecné vyjádření Fickova prvního zákona přepsat do rovnice 2, ve které index  $i$  značí i-tou

pozici a  $\frac{\partial c}{\partial x_i}$  je koncentrační gradient. Rovnice 2 je velmi častým vyjádřením popisu pasivní volné difuze neelektrolytu biologickou membránou.<sup>26</sup>

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x_i} \quad (1)$$

Pro ideální roztok či směs lze koncentrační gradient v jednodimenzionální představě nahradit vztahem 3 který popisuje Fickův první zákon pomocí termodynamických veličin. Symbol  $R$  značí univerzální plynovou konstantu,  $T$  termodynamickou teplotu a  $\mu$  chemický potenciál.

$$J = -D \frac{c}{RT} \frac{\partial \mu}{\partial x_i} \quad (2)$$

Dále je nutné si uvědomit, že koncentrace látky se difundující pře biologickou membránu není stále stejná, ale s časem se mění. Tuto skutečnost popisuje tzv. Fickův druhý zákon, který je matematicky popsán rovnicí 4, kde  $\nabla^2$  je Laplaceův operátor<sup>25</sup>.

$$\frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = -\nabla \cdot J = D \nabla^2 c(\mathbf{r}, t) \quad (3)$$

Fickův druhý zákon lze vyjádřit také jinými matematickými formulacemi, nicméně já jsem zvolila tuto, protože tento tvar lze vyřešit pomocí Fourierovy transformace.<sup>25</sup>

Představíme-li si, jak prochází látka bariérou, dostáváme vztah 5, který dává do souvislosti difuzní tok a koncentrace difundující sledované látky na obou stranách membrány, kde  $P$  je permeabilitní koeficient s jednotkami cm/s.<sup>26</sup>

$$P = \frac{J}{\Delta c} \quad (4)$$

Nejčastěji se setkáváme s logaritmem permeabilitního koeficientu. Tato veličina je zásadní pro studium léčiv a jejich chování na modelových a biologických membránách. Můžeme jej učit experimentálně i teoreticky.

## 2.2 Vliv chemických vlastností xenobiotika na transport membránou

Jak již bylo uvedeno výše v textu, biologické membrány jsou obecně nepropustné pro velké molekuly a ionty. U látek, které mají potenciál membránou procházet rozhodují další vlastnosti např. lipofilita, ionizace.

Velkou část biologické membrány tvoří lipidy. Látky, které jsou nepolární povahy, se budou schopny v membráně rozpouštět a procházet prostou difuzí do intracelulárního prostoru buňky. Abychom mohli kvantifikovat míru rozpustnosti xenobiotika

v membráně, zavádíme rozpustnost látky v biologické membráně jako rozdělovací koeficient<sup>c</sup> látky v membránových lipidech a ve vodné fázi (rovnice 6).<sup>27</sup>

$$P_{l/v} = \frac{c_l}{c_v} \quad (6)$$

Veličina  $c_l$  je koncentrací látky v lipidové vrstvě a  $c_v$  ve vodné vrstvě za rovnovážného stavu.<sup>27</sup>

Další kritickou vlastností, která ovlivňuje schopnost látky procházet membránou je ionizace. Velká část léčiv má charakter slabých kyselin či bází, které se disociují na základě okolí. Jejich disociaci si lze přestavit dle chemických rovnic 7, kde  $HA$  je obecná slabá kyselina,  $H^+$  je odštěpený vodíkový proton,  $A^-$  je anion kyseliny (konjungovaná báze kyseliny  $HA$ ),  $B$  je obecná slabá báze,  $BH^+$  je protonovaná báze (konjungovaná kyselina báze  $B$ ).<sup>27</sup>



Pomocí úpravy Hendersonovy-Hasselbachovy rovnice lze odvodit vztah pro výpočet protonované a neprotonované formy molekuly. Jak ukazuje rovnice 8.<sup>27</sup>

$$\log \left[ \frac{\text{protonovaná forma}}{\text{neprotonovaná forma}} \right] = pK_D - pH \quad (8)$$

Pro bazické látky je protonovaná forma ionizovaná, přičemž pro kyselé látky je protonovaná forma neionizovaná, jak ukazují rovnice 7. Obecně lze říci, že ionizované formy jsou hydrofilní, zatímco neionizované formy jsou obecně lipofilnější. Neionizované formy mohou difundovat membránou, zatímco ionizované molekuly nedokáží prostoupit biologickou membránou.<sup>27</sup>

Pokud se budeme zabývat reálnými biologickými systémy, tak pH lze považovat v dané části organismu za konstantu. Z tohoto lze jednoduše usoudit, že disociace léčiva bude závislá na jeho disociační konstantě  $K_D$ . Poté můžeme tvrdit, že obecně kyselé povahy se budou mnohem více hromadit v prostředí o vyšším pH, zatímco léčiva bazická budou hromaděna kyselém prostředí. Důvodem je v daných prostředích jsou více ionizovaná a tedy budou zadržovány membránami.<sup>27</sup>

### 2.3 Transport látky membránou kůže

Jak již bylo nastíněno ve výše uvedeném textu, kůže vykazuje mimořádné bariérové vlastnosti. Nicméně existuje několik cest, jakými může léčivo proniknout skrze tuto

---

<sup>c</sup> Rozdělovací (partiční) koeficient často bývá stanovován pro danou látku jako rozdělovací koeficient mezi oktánolem a vodou, který je popsán jako poměr rovnovážných koncentrací dané látky v oktanolu ku rovnovážné koncentraci této látky ve vodě. Přičemž ve své logaritmované podobě patří mezi základních charakteristiky, které pro popis chování látky na membráně lze použít, jelikož ho lze interpretovat jako míru lipofility látky. Jelikož platí, že čím je hodnota jeho logaritmu vyšší, tím je látka lipofilnější.<sup>74</sup>

bariéru. Vedle cest, které jsou dány anatomicky jako je průnik mazovými a potními žlázami či transfolikulární průnik, které jsou sice možné ale více méně minoritní a v textu této práce s nimi nebude dále operováno, existují mnohem pravděpodobnější cesty léčiva do organismu skrze kůži. Jsou to to transcelulární a intercelulární průnik. Transcelulární průnik je realizován skrze korneocyty a je poměrně obtížný. Pokud jej chceme realizovat je možno jej usnadnit zvýšením obsahu vody v *SC*. Mnohem snadněji realizovatelným je intercelulární průnik. Ten probíhá přes lipidové lamely.<sup>4</sup> Lipidová matrix *SC* je dodnes intenzivně studována a bude rovněž jedinou cestou léčiva do organismu, která bude v textu práce studována.

### 3. Metody studia biologických membrán

Metody studia biologických membrán<sup>D</sup> obecně lze rozdělit na experimentální a teoretické. Vzhledem k charakteru práce bude věnována pozornost především teoretickým metodám, především metodě COSMOmic.

Ke sledování průchodu látek přes kožní bariéru je možné využít hned několik přístupů. Jedná se o *in vivo* testování na člověku či zvířeti, *in vitro* testování, které se realizuje buď na člověku nebo zvířeti nebo na membráně člověka či zvířete a posledním možným přístupem je testování *in silico*, který využívá metod výpočetní chemie. Testování na zvířecích modelech vyvolává velké množství nevole u organizací na ochranu zvířat a dochází proto ke zpřísnování legislativy upravující *in vivo* testy.<sup>7,16</sup>

Momentálně je snaha intenzivní snaha o omezování zvířecích modelů pro vědecké účely. V rámci Evropské unie je v platnosti směrnice<sup>E</sup> o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely z roku 2010. Směrnice se nese v duchu postupného zavádění pravidel známých pod zkratkou 3Rs. Princip 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) je založen nahrazení nebo vyhýbání se metodám experimentu, které vyžadují zvířata. Jednou z možností nahrazení jsou i metody výpočetní chemie. Dále 3Rs princip zahrnuje omezení počtu zvířat používaných na jeden experiment a posledním pilířem tohoto principu je zlepšení podmínek pro zvíře jako například snížení stresu.<sup>28</sup>

#### 3.1. Experimentální metody studia membrán

Z celé škály experimentálních metod, které lze použít pro studium biologických membrán můžeme vyzdvihnout několik metod, které byly využity pro poznání struktury kůže:

- První skupinou používaných metod jsou metody difrakční, zejména metoda difrakce Rentgenova záření,<sup>29</sup> neutronová difrakce.<sup>12,13,30</sup>
- Ze spektrálních metod je zásadní metoda infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR).<sup>31,32</sup>
- V oblasti mikroskopických metod jsou využívány kryoelektronová mikroskopie<sup>14,15</sup> a mikroskopie atomárních sil (AFM).<sup>31</sup>
- Využití pro studium kůže nalézají i metody separační např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).<sup>31,32</sup>

---

<sup>D</sup> Následující řádky budou věnovány metodám, které se používají pro studium biologických membrán, nicméně zejména v podkapitole 3.1. experimentální metody budou vyzdvíženy ty, jež se hodí pro studium kůže.

<sup>E</sup> Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes<sup>75</sup>

## 3.2. Teoretické metody studia membrán

### 3.2.1 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika jakožto metoda výpočetní chemie je založená na postupné změně studovaného systému popsaného pomocí jednotlivých atomů. Změny systému nastávají na základě Newtonových pohybových zákonů<sup>f</sup>, resp. Newtonových pohybových rovnic. Výsledkem po vyřešení příslušných rovnic je trajektorie, která specifikuje pozici a rychlost každé částice v systému, jak se vyvíjejí v čase.<sup>33</sup>

### 3.2.2 COSMOmic

COSMOmic je softwarový nástroj, který umožňuje studium chování látek na micelárních systémech a na biologických membránách. Ústředními pojmy, které si je třeba v souvislosti s tímto software zavést jsou: solvent a anizotropický solvent. Solventem je v tomto kontextu myšleno prostředí (např. voda), ze kterého by látka (ligand) X přestupovala do anizotropického solventu. Anizotropickým solventem je v případě COSMOmicu myšlena v micela či jako v případě této práce modelová membrána.<sup>34</sup>

Nejdříve dochází k vygenerování konformeru studovaného ligandu X pro výpočet pomocí programu ligprep<sup>35</sup>. Dalším krokem je výpočet rozložení polarizované hustoty náboje na povrchu molekuly ligandu X. Toto zajišťuje COSMO-RS metoda<sup>36</sup>, využívající teorii funkcionálu hustoty (DFT)<sup>6</sup> s použitím funkcionálu B3LYP. Následně se zpracuje histogram polarizační hustoty náboje tzv.  $\sigma$ -profil studované látky  $p_X$  a stejně tak se zpracovává také solvent  $p_S$ .  $\sigma$ -profil popisuje distribuci všech povrchových elementů zkoumané molekuly, tedy hustotu náboje na povrchu molekuly. Srovnáním  $\sigma$ -profilů mezi solventem a ligandem je možné vypočítat solvatační energii molekuly v dotyčném prostředí.

Další kroky směřují k výpočtům v membráně.<sup>h</sup> Místo isotropního solventu je membrána nehomogenní anizotropický solvent, a tak COSMO-RS nahrazujeme programem COSMOmic.<sup>34,37</sup> COSMOmic rozdělí membránu do vrstev s ohledem na její anizotropické složení ve vrstvách. V případě biologické membrány rozdělení je horizontálně do dvou vrstev podél normály dvojvrstvy. Ke každé vrstvě membrány  $M$  přistupuje COSMOmic jako k homogenní kapalině. Zohledněno je jak rozdílná hustota, tak i případné odlišné chemické složení jednotlivých vrstev, tedy asymetrie membrány. Pravděpodobnost rozdělení jednotlivých povrchových segmentů vrstvy

---

<sup>f</sup> Jedná se o zákony klasické mechaniky, které jsou běžně v češtině nazývány jako zákon setrvačnosti, zákon síly a zákon akce a reakce.

<sup>6</sup> Teorie funkcionálu hustoty DFT je metodou výpočetní chemie, která je v nejjednodušším přiblížení založena na myšlence, že energie molekuly je funkcí elektronové hustoty a elektronová hustota je funkcí polohy jader dané molekuly.<sup>76</sup>

<sup>h</sup> Popis výpočtu je univerzálně platný pro jakýkoliv anizotropický solvent (membrána, micela) jak byl stručně popsán výše, nicméně pro větší přehlednost textu a vzhledem k charakteru práce, budou pojmy membrána a anizotropický solvent zaměňovány.

membrány odpovídá specifickému  $\sigma$ -profilu vrstvy  $p_M$ , který je následně algoritmem podobným COSMO-RS převeden na specifický  $\sigma$ -potenciál vrstvy  $\mu_M$ .<sup>34,37</sup>

Membrána je tedy nahrazena systémem kapalinových vrstev, kde je studovaná látka  $X$  zafixována v každé z vrstev membrány pro každou vrstvu  $i$ , má svoji definovanou orientaci  $j$ . Chemický potenciál látky  $X$  lze vypočítat dle vztahu 9.<sup>37</sup>

$$\mu_M(z_i, \mathbf{d}_j) = \mu_{CRS}(z_i, \mathbf{d}_j) + \mu_{comb}(z_i, \mathbf{d}_j)^1 \quad (9)$$

Kde  $z$  je souřadnice podél normály membrány a  $\mathbf{d}$  je orientace molekuly  $X$ . Je důležité poznamenat, že vzhledem ke skutečnosti, že membrána je rozdělena do  $n$  vrstev s  $m$  možnými orientacemi molekuly  $X$ . Pravděpodobnost nalezení molekuly  $X$  v dané vrstvě membrány  $M$  lze vypočítat, dle vztahu 10.<sup>37</sup>

$$p_{(z_i)} = \frac{\sum_{j=1}^m e^{-\beta \mu_M(z_i, \mathbf{d}_j)}}{\sum_{k=j}^n \sum_{j=1}^m e^{-\beta \mu_M(z_i, \mathbf{d}_j)}} \quad (10)$$

Kde pro  $\beta$  platí  $\beta = \frac{1}{k_B \cdot T}$ ,  $k_B$  je Boltzmannova konstanta a  $T$  teplota. Vypočítané pravděpodobnosti pro jednotlivé vrstvy lze využít následně k výpočtu profilu volné energie pro molekulu  $X$ .<sup>34,37</sup>

$$\Delta G_{(z_i)} = -k_B T \ln \frac{p_{(z_i)}}{p_{(r_n)}} \quad (11)$$

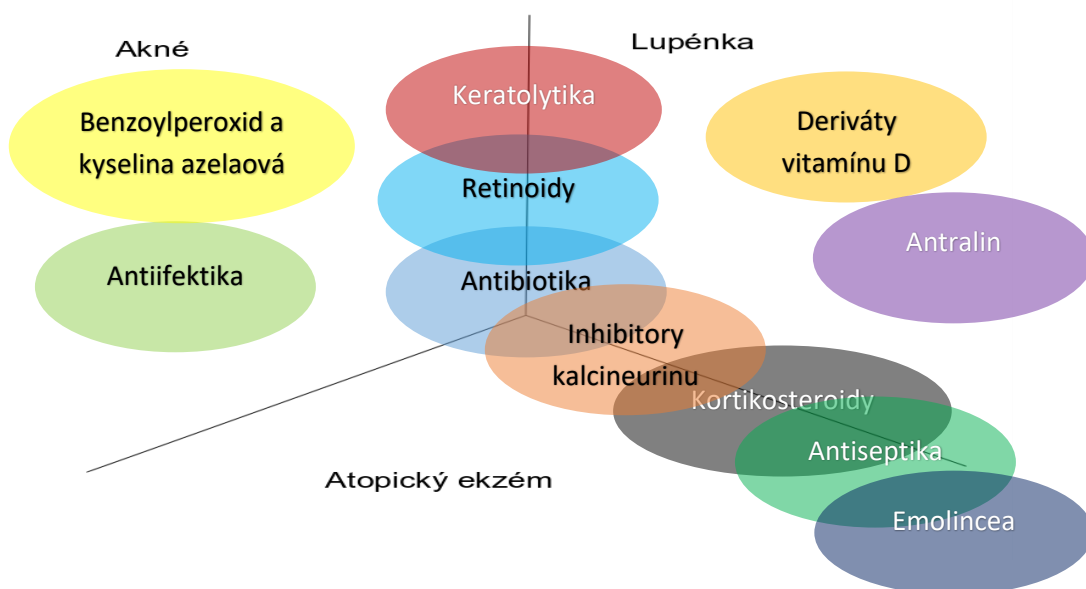
Profil volné energie podél osy  $z$  lze následně využít rovněž pro výpočet partičního koeficientu membrána-solvent (např. voda) pro látku  $X$  ( $\log K_m$ ), stanovení optimální pozice látky v membráně ( $X_{min}$ ) a výpočtům jednotlivých bariér, které látka musí překonávat ve středu membrány ( $\Delta G_{pen}$ ) a při výstupu z membrány do vodního prostředí ( $\Delta G_{wat}$ ).

---

<sup>1</sup>Zkratka *CRS* se vztahuje k části chemického potenciálu, který určila COSM-RS metoda a zkratka *comb* označuje tzv. kombinatoriální příspěvek. Kombinatoriální příspěvek zahrnuje velikostní a tvarové poměry molekul ligandu a solventu.<sup>34</sup>

## 4. Dermatologická léčiva

V následující kapitole se omezím na zásadní léčiva používaná na nemoci popsané v kapitole 1.2. Onemocnění kůže. V této kapitole budou rovněž uvedeny teoretické principy lokální terapie a konkrétní kombinace léčiv, která se v praxi používají (viz Obrázek 7).



**Obrázek 7:** Grafické znázornění jednotlivých onemocnění kůže a používaných léčiv

### 4.1 Obecné principy lokální terapie v dermatologii

V případě dermatologických léčiv je ve většině případů nesmírně důležité, aby účinná látka mohla penetrovat skrze SC a následně mohla pronikat dále do epidermis a svrchní dermis, zatímco absorpce do dermálních krevních a lymfatických cest je vesměs nežádoucí.<sup>38</sup>

Cestu dermatologického léčiva organismem můžeme rozdělit na několik dílčích kroků. Pro zjednodušení situace budeme uvažovat obecné léčivo složené z účinné látky (aktivní ingredience; AI) a vehikula, které bude kůží procházet difúzí. Můžeme obecně říci, že při každém kroku cesty léčiva organismem musí platit, že AI je rozpustnější než vehikulum nebo musí být její postup hnán koncentračním gradientem, aby docházelo k pronikání do hlubších vrstev.<sup>38</sup>

Prvním krokem je uvolnění AI z vehikula. V druhém kroku – adsorpci následuje navázání AI na SC. Ve třetím kroku probíhá vstřebání účinné látky z vehikula. Vstřebání je umožněno zvýšenou rozpustností AI v lipidové matrix. Ve čtvrtém kroku probíhá penetrace a v pátém permeace. Pojem *penetrace* je v dermatologii vyhrazen pro průchod látky skrze hlavní kožní bariéru – *stratum corneum*, zatímco pojmem *permeace* se v tomto případě rozumí průchod skrze další bariéry např. nižší vrstvy epidermis nebo dermis. Posledním krokem je resorpce, tedy vstřebání do cévního systému organismu.<sup>38</sup>



Jelikož uvolnění účinné látky z vehikula je hned prvním krokem při kontaktu přípravku s kůží, je výběr nejvhodnějšího vehikula jednou z nejzásadnějších otázek.<sup>38</sup> Vehikula mohou být nejrůznějšího chemického složení (viz Tabulka 2). Obecně je lze rozdělit na: masti, krémy, roztoky, lotia, gely, pasty, tekuté pudry a laky.<sup>38</sup> Přičemž pro tuto práci budou nejzajímavější masti, krémy a gely.

**Tabulka 2:** Popis hlavních dermatologických vehikul s charakterizací jejich chemického složení (vytvořeno dle Ref.<sup>38</sup>)

Vehikulum	Popis	Chemické složení
<b>Krém</b>	Existuje ve dvou emulzivních formách: voda v oleji (v/o) nebo olej ve vodě (o/v) <sup>38</sup>	Základy krémů jsou známy pod svými obchodními názvy např. Ambiderman (o/v), Neoquasorb (o/v), Cremor leniens (v/o) <sup>38</sup>
<b>Lotio</b>	Řídká forma krému <sup>38</sup>	-
<b>Roztok</b>	Léčivo je rozpuštěno v kapalině <sup>39</sup>	Rozpouštědlo: ethanol, voda, aceton, formaldehyd <sup>38</sup>
<b>Mast</b>	Nejsou vodou smývateľné a zabraňují ztrátě vody v kůži. Účinné látky v nich rozpuštěné pronikají bariérami kůže pomalu, ale do hlubších vrstev <sup>38</sup>	Hydrofobní základy mastí: žlutá a bílá vazelína, vepřové sádlo... <sup>40</sup> Hydrofilní základy mastí: jsou tvořeny polyethylenglykoly <sup>40</sup>
<b>Gel</b>	Před aplikací je polotuhý, po aplikaci se stává tekutým <sup>38</sup>	Jsou tvořeny bobtnající látkou a hydrofilního rozpouštědla (hydrogely) nebo olejofilního rozpouštědla (olejogely) <sup>40</sup>
<b>Pasta, tekutý pudr</b>	Pastu tvoří jí mast a zásyp Tekutý pudr je tvořen vodou a zásypem <sup>38</sup>	Škroby: rýžový, bramborový, pšeničný Minerální zásypy: oxid zinečnatý, oxid hořečnatý, uhličitán vápenatý, oxid titaničitý... <sup>41</sup>
<b>Lak</b>	Speciální případ roztoku <sup>38</sup>	-

Pokud se budeme dívat na léčivo a na vehikulum jen jako na chemická individua, můžeme částečně odvodit schopnost léčiva uvolnit se z vehikula na základě hydrofility případně lipofility těchto látek. Můžeme obecně říci, že ochota léčiva opustit vehikulum bude tím větší, čím větší bude rozdíl mezi hydrofilitou jednoho a lipofilitou druhého (viz Tabulka 3).<sup>42</sup>

**Tabulka 3:** Prostupnost léčiva membránou SC pasivní difuzí v závislosti na vlastnostech léčivé látky a vehikula (vytvořeno dle Ref.<sup>38</sup>)

	Lipofilní léčivo	Hydrofilní léčivo
Lipofilní vehikulum	Prochází (teoreticky)	Neprochází
Hydrofilní vehikulum	Prochází velmi dobře	Neprochází

Pokud má ale léčivo prostoupit kůží, nestačí jen že dokáže opustit vehikulu, ale musí dokázat projít membránou SC. Jelikož SC je lipofilní vrstva, prostupují do ní lépe látky lipofilní povahy než látky hydrofilní. Naopak v případě, že je žádoucí, aby léčivo

zůstávalo na povrchu kůže (např. dermatologická antibiotika) je vhodné zvolit takový případ, kdy díky chemickým vlastnostem léčiva a vehikula bude léčivo zůstávat na kůži a nebude se vstřebávat.<sup>42</sup>

Zatím jsem diskutovala pouze obecné skutečnosti v případě, že léčivý přípravek tvoří účinná látka a vehikulum. Nicméně takový případ v reálném světě často nenastává a léčivé přípravky jsou doplňovány ještě dalšími přidanými látkami. Tyto látky jsou přidávány za nejrůznějšími účely např. prodloužení doby expirace přípravku nebo pro zabránění množení mikroorganismů. Někdy jsou záměrně přidávány rovněž látky schopné ovlivňovat penetraci účinné látky kůží např. povrchově aktivní látky – propylenglykol, urea atd. - jsou schopné ovlivňovat lipoidní části membrány SC a zvyšovat tak penetraci kortikosteroidů kůží.<sup>40,43</sup>

#### 4.2 Dermatologické enhancery, keratolytika, emolincea a humektanty

**Dermatologické enhancery** jsou látky z různých skupin chemikálií, které spojuje jejich vlastnost zvyšovat penetrační schopnost jiné látky. Ideální enhancer je netoxická látka, která nedráždí organismus a nevykazuje žádnou farmakologickou aktivitu. Dále by měl mít reprodukovatelnou a předpověditelnou dobu trvání jeho účinku nebo by neměl dlouhodobě narušovat bariérové vlastnosti kůže. Nicméně doposud není známa žádná struktura, která by všechny vyjmenované vlastnosti splňovala.<sup>44</sup> (viz obrázek 8)

Za **emolincea** jsou v dermatologii považovány látky schopné změkčovat a zvláčňovat kůži, zároveň některá z nich mají rovněž hydratační účinek a jsou tak schopná zlepšovat prostupnost kožní bariéry. Pro tyto své vlastnosti jsou emolincea hojně využívána při léčbě lupénky.<sup>45</sup>

**Keratolytika** jsou látky schopné odstraňovat keratin ze *strata cornea*, čímž redukuje rohovou vrstvu kůže. Pro tuto svoji vlastnost jsou hojně využívána při terapii akné a lupénky.<sup>38</sup> Mezi zástupce keratolytik používaných pro léčbu lupénky patří: kyselina salicylová, kyselina mléčná, propylenglykol a urea.<sup>45</sup> Pro akné je poté nejvýznamnější zástupce v lékových přípravcích benzoyl peroxid a kyselina azelaová.<sup>21,46</sup>

Výše zmíněná léčiva vykazují i řadu dalších vlastností, pro které jsou tak rozšířenými v praxi. Propylenglykol, ureu a kyselinu mléčnou lze považovat díky jejich hydratačním účinkům za humektanty. Pojmem **humektant** je v dermatologii rozuměna látka, která je schopná vázat vodu ve SC. [43, 46]

##### 4.2.1 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová vykazuje vedle keratolytického účinku i účinky fungicidní a baktericidní, podobně jako benzoyl peroxid, který má antibakteriální a silné oxidační účinky.<sup>38</sup>

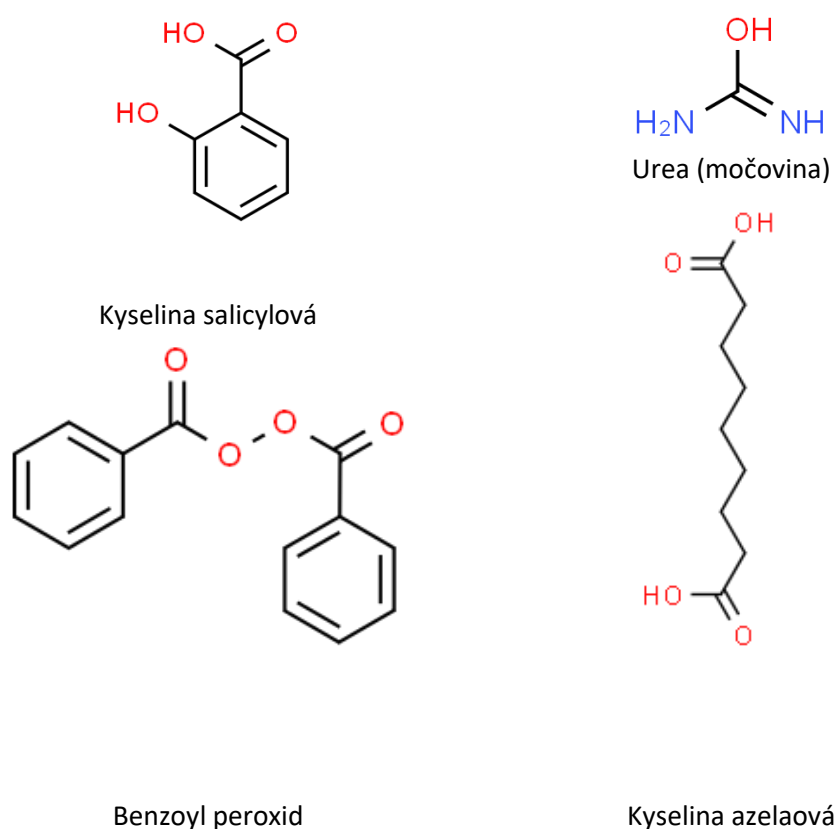
Je o ní známo, že do kůži proniká interceluární cestou. Díky tomuto je také schopná zlepšovat penetraci spolu s ní nebo po ní aplikovaných dalších látek např. kortikosteroidů nebo tretinoinu.<sup>20,43</sup> S touto její schopností je spojena také skutečnost,

že nesmí být použita na více než 20 % těla, jelikož hrozí pacientovi tzv. salicylátová toxicita.<sup>45</sup>

#### 4.2.2 Urea (močovina)

Schopnost zvýšit penetraci kůže ureou je dána kombinací dvou skutečností. Za prvé urea zvyšuje obsah vody v rohové vrstvě kůže a za druhé vykazuje keratolytickou aktivitou. Urea sama o sobě nevykazuje schopnost zvyšovat penetraci, tak výraznou jako její syntetická analoga. Nicméně hydratační účinek lze podpořit kombinací s mléčnanem amonným a keratolytický efekt zase podporuje použití močoviny s kyselinou salicylovou.<sup>44</sup>

Další velmi významnou dermatologickou vlastností močoviny je její schopnost hydratovat a zvyšovat obsah vody v kůži a přispívat k její dobré kondici.<sup>44</sup>



**Obrázek 8:** Struktury dermatologických enhancerů. Obrázky převzaty z databáze ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)

#### 4.2.3 Benzoyl peroxid

Jedná se bílou krystalickou látku rozpustnou ve vodě i olejích, vykazující silné oxidační účinky, která vykazuje keratolytický a antibakteriální účinek. Z hlediska antibakteriálního je významná jeho schopnost hubit *Propionibacterium acnes*<sup>1</sup> (*p.acnes*).<sup>46</sup>

<sup>1</sup> *Propionibacterium acnes* je Gram-positivní bakterie, která může být přítomna na kůži postižené akné nebo jinou kožní chorobou a vede ke zhoršení stavu onemocnění.<sup>77</sup>

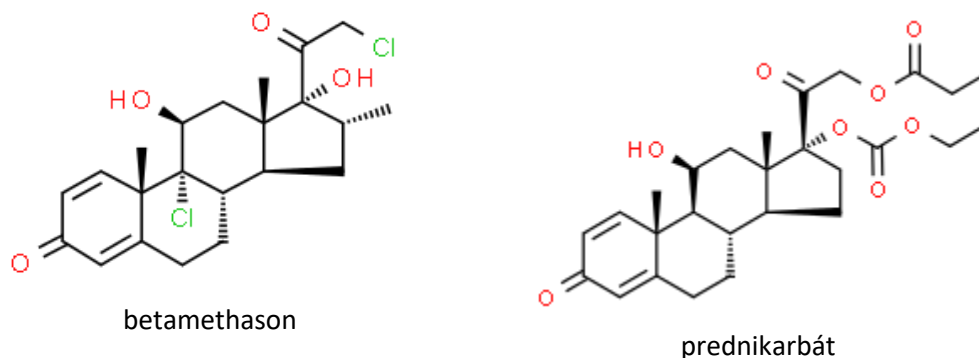
#### 4.2.4 Kyselina azelaová

Jedná se o dikarboxylovou kyselinu, která je v dermatologii využívána pro léčbu akné. Vykazuje hned několik zajímavých vlastností, které determinují její použití. Předně podobně jako benzoylperoxid dokáže hubit *Propionibacterium. acnes*, takže vykazuje antibakteriální aktivitu. Dále vykazuje účinek proti zánětlivý a keratolytický.<sup>49</sup>

Antimikrobiální účinek, který kyselina azelaová má, vykazuje schopnost snižovat podíl volných mastných kyselin v povrchové vrstvě kožních lipidů, a díky tomu vykazuje také antiseboritický účinek.<sup>27</sup>

#### 4.3 Kortikosteroidy

Kortikosteroidy jsou skupinou látek, které se používají v dermatologii k léčbě různých zánětlivých a proliferačních dermatóz, jako jsou například atopický ekzém a lupénka. Mají steroidní skelet (viz obrázek 9). Pro obě dvě onemocnění se jedná o léky první volby při akutních stavech onemocnění.<sup>45,50</sup> Jak již bylo naznačeno léčebný efekt kortikosteroidů tkví v jejich protizánětlivé, imunosupresivní a antiproliferační aktivitě.<sup>50</sup>



**Obrázek 9:** Struktury kortikosteroidů. Obrázky převzaty z databáze ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)

Kortikosteroid proniká plazmatickou membránou buňky a následně se váže na kortikosteroidový receptorový protein (NR3C1). Tento receptor, který je hojně zastoupen ve vnitřním prostředí téměř všech buněk a buňky tvořící kůži nevyjímaje, je schopen vázat molekuly látek rozpustné v tucích. Receptor je tvořen dvěma proteiny Hsp 90 (heat shock protein 90). Hsp 90 působí jako chaperon<sup>k</sup>, který zabraňuje, aby neobsazený receptor procházel do buněčného jádra. Poté co se kortikosteroid naváže na NR3C1 se Hsp 90 od molekuly odloučí a je odhaleno aktivní místo.<sup>50</sup>

Po odhalení aktivního centra aktivovaný komplex kortikosteroid-receptor proniká do jádra buňky. Zde se je schopen vázat na specifické responsivní struktury DNA (glucocorticoid-responsive-elements) - GREs. Díky tomuto dochází k ovlivňování transkripce, a následně díky tomu k syntéze proteinů citlivých na glukokortikoidy.

<sup>k</sup> Molekulové chaperony jsou látky přítomné nejen v lidském organismu. Jejich úlohou je být nápomocné při skládání proteinů. Zabraňují v průběhu skládání proteinu nežádoucí agregaci a tím významně přispívají ke správné výsledné struktuře sbalovaného proteinu.<sup>24</sup>

Vzniká tak lipokortin<sup>L</sup>, který dokáže tlumit metabolity kyseliny arachidonové (prostaglandiny, leukotrieny a tromboxy).<sup>43</sup>

Kortikosteroidní receptor je schopen ovlivňovat transkripci genů přímo nebo prostřednictvím regulace transkripčních faktorů AP-1 (aktivační protein 1) a NF-κB (nuclear factor-κB). Tím to mechanismem využívajícím prostředníka je potlačena exprese celé řady genů např. IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF-α (tumor necrosis factor-α), GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), cyklooxygenázy II. typu a kolagenázy. Některé studie naznačují, že ovlivňování exprese cytokinů<sup>M</sup> pomocí kortikosteroidů je dáno schopností glukokortikoidů ovlivňovat poměr mezi pomocnými lymfocyty Th1 a Th2.<sup>43</sup>

Aby mohl kortikosteroid splnit svojí léčebnou úlohu je nezbytně nutné jeho uvolnění z vehikula léčebného přípravku a penetrace SC směrem do nižších vrstev k živým buňkám kůže, které obsahují kortikosteroidní receptory a umožní tak dle výše popsaného mechanismu léčebný účinek. Následně poté kortikosteroidy pronikají kožním lymfatickým systémem do krevního oběhu, kde jsou dále metabolizovány organismem a poté vyloučeny převážně ledvinami.<sup>43</sup>

V této práci se vzhledem k jejímu tématu zaměřím jen na penetraci kortikosteroidu kůží.

Pokud budeme chtít zkoumat penetraci kortikosteroidu jen z hlediska konkrétních přípravků, je nutné si uvědomit, že bude závislá na fyzikálních a chemických vlastnostech konkrétního kortikosteroidu a na konkrétním vehikulu. (Budeme-li uvažovat nejjednodušší modelový případ, kdy je přípravek tvořen pouze kortikosteroidem a vhodným vehikulem.) Kortikosteroidy lze z fyzikálně-chemického hlediska rozdělit dle jejich rozpustnosti ve vodě. Pro kortikosteroidy ve vodě rozpustné platí, že pronikají do vrstvy *strata cornea* rychle, nicméně vzhledem k chemickému okolí a nemožnosti se zde metabolizovat postupují jen pomalu dále do hlubší vrstev epidermis. Rychleji jsou do hlubších vrstev schopny postupovat hydrofóbnější kortikosteroidy. Pro tyto lipofilní sloučeniny rovněž platí, že mají větší schopnost se vázat na kortikosteroidní receptory organismu, a také jsou v dermatologii zástupci těch účinnějších kortikosteroidů.<sup>43</sup>

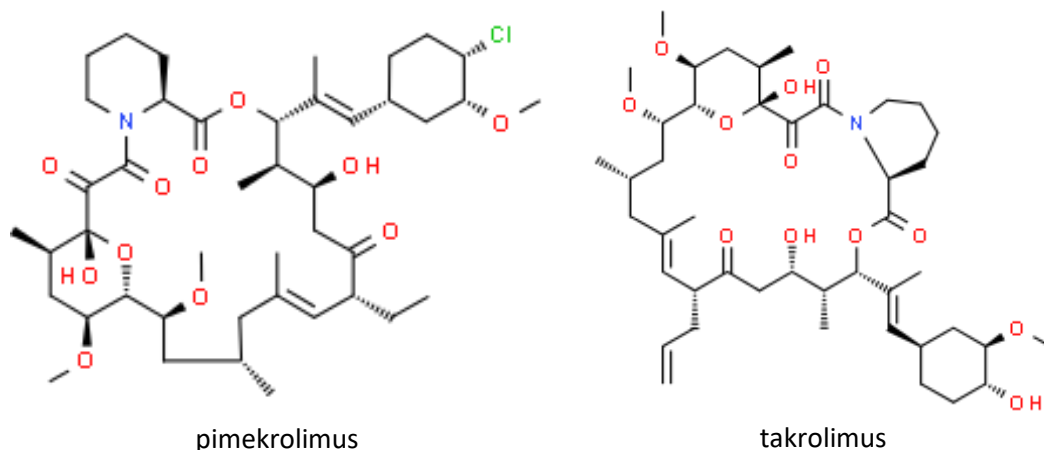
#### 4.4 Inhibitory kalcineurinu

Topické inhibitory kalcineurinu (TCI; obrázek 10), které jsou používané v dermatologii jsou tacrolimus a pimecrolimus. Oba dva patří k nejnovějším lékům, které se v současnosti v dermatologii používají na léčbu AD a lupénky.<sup>51</sup> Z hlediska mechanismu účinku jsou inhibitory kalcineurinu látky způsobující inhibici

---

<sup>L</sup> Lipokortin je nejstarším známým protizánětlivým proteinem, jehož vznik je indukován kortikosteroidy. Dalším proteinem, který vzniká při léčbě kortikosteroidy je vazokortin. Vazokortin je schopen snižovat permeabilitu cév ložisku zánětu.<sup>43</sup>

<sup>M</sup> Cytokiny jsou polypeptidy, které jsou uvolňovány buňkami imunitního systému v reakci na nejrůznější podněty. Cytokiny jsou širokou skupinou látek, mezi které patří interleukiny (IL), faktor nekrotizující nádory (TNF) a další.<sup>78</sup>



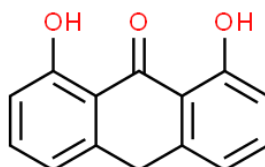
**Obrázek 10:** Struktury inhibitorů kalcineurinu. Obrázky převzaty z databáze ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)

T-lymfocytů a tím potlačení tvorby prozánětlivých cytokinů. Je známo, že se v cytoplazmě cílové buňky váží intracelulární protein zvaný macrophilin-12 (také zvaný FK506-binding protein), po navázání dále postupují buňkou a jak název napovídá jejich imunopresivní aktivita spočívá ve snížení aktivity enzymu kalcineurinu (EC 3.1.3.16) a následně jak již bylo zmíněno k potlačení prozánětlivých cytokinů.<sup>51,52</sup>

Jedná se o látky s relativně velkou molekulovou hmotností. Tato skutečnost je příčinou, proč TCI jsou tak málo absorbovány skrze kůži. Přičemž experimentální pozorování ukazují, že se zlepšujícím se stavem kůže je schopnost procházet membránou kůže nižší. Nejlépe prochází v případě atopického ekzému v počáteční fázi léčby, kdy je kůže velmi narušena a zánětlivé procesy jsou v pokročilé fázi.<sup>51</sup>

#### 4.5 Protizánětlivá léčiva

Jediné protizánětlivé léčivo, které je v této práci zmíněno je antralin (v češtině používanější názvy jsou cignolin nebo dithanol). Antralin je antracénový derivát, který se běžně používá k léčbě lupénky. V současné době je předpokládá, že mechanismem účinku antralinu je blokáda mitochondriální buněčné oxidace a vznik volných radikálů. (viz Obrázek 11)<sup>45</sup>



**Obrázek 11:** Struktura protizánětlivého léčiva Anthralinu. Obrázky převzaty z databáze ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)

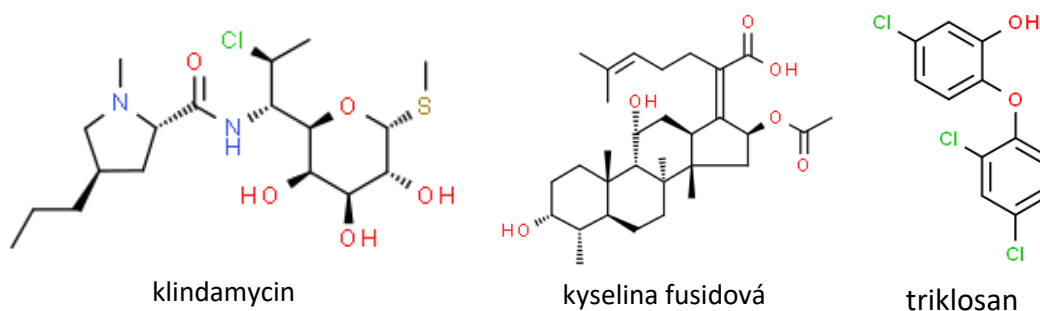
#### 4.6 Antibiotika, antiinfektiva a antiseptika

##### 4.6.1 Antibiotika

Většina antibiotik, která jsou v rámci této práce zmíněna spojuje mechanismus jejich účinku, kterým je inhibice syntézy bílkovin, která je způsobená zásahem do ribosomu dané bakterie. V případě tetracyklinu dochází k reverzibilní vazbě na receptor na 30S podjednotce a blokáci vazby amimoacyl-tRNA na akceptorové místo komplexu

mRNA a ribozomu. Aminoglykosidy (gentamicin) se váží také na 30S podjednotku, ale ireverzibilně a mechanismus jejich účinku není zcela znám. Makrolidová antibiotika (erythromycin a natamycin) se váží na receptor, který je lokalizovaný na 50S podjednotce podobně jako linkosamidy (klindamycin, viz obrázek 12) a takto inhibují syntézu bílkovin.<sup>27</sup>

Dalším velmi hojně používaným antibiotikem je kyselina fusidová, což je antibiotikum, které vykazuje steroidní charakter (viz obrázek 12). Mechanismus jeho účinku je založen na zainhibování syntézy proteinů, které tvoří buněčnou stěnu daného mikroorganismu.<sup>27</sup>



**Obrázek 12:** Struktury topikálně podávaných antibiotik a antinfektiv (triklosan). Obrázky převzaty z databáze ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)

#### 4.6.2 Antiinfektiva a aniseptika

Antiseptiky se označuje skupina látek, které dokáží zneškodnit mikroorganismy v prostředí živých tkání. Důležitá je také jejich koncentrace v přípravku, aby nedocházelo k poškození tkání pacienta. Typickým zástupcem je chlorhexidin či triclosan (viz obrázek 12).<sup>27</sup>

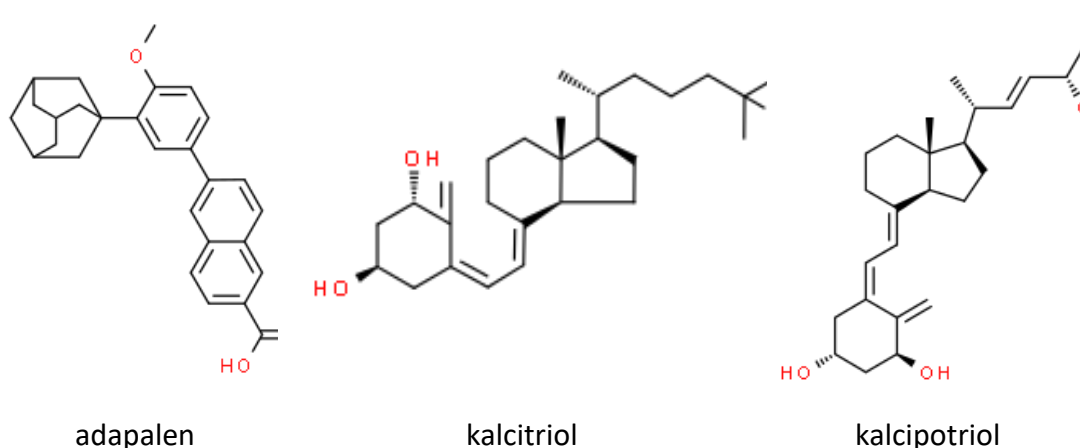
Velmi významnou skupinou látek, které vykazují antiseptické účinky patří oxidancia. Oxidancia hubí mikroorganismy oxidací proteinů nebo inaktivací enzymů, tím že se rozkládají a vzniká atomární kyslík. Mezi oxidancia patří také benzoylperoxid (podkapitola 4.2.3).

#### 4.7 Retinoidy, jejich analogy a deriváty vitamínu D

Obě dvě tyto skupiny látek patří mezi deriváty vitamínů. Obě dvě tyto skupiny jsou hojně využívány v dermatologii pro léčbu lupénky.(viz Obrázek 13)<sup>45</sup>

##### 4.7.1 Retinoidy

Jedná se o deriváty vitamínu A. Z dermatologického hlediska je důležitá jejich schopnost ovlivňovat epidermální růst a diferenciaci buněk. Při hyperproliferaci buněk jsou schopné ji tlumit, a to je činí užitečnými při léčbě lupénky.<sup>53</sup> Jejich další vlastností je schopnost snižovat tvorbu komedonů, a proto jsou rovněž využívány při léčbě akné.<sup>21</sup>



**Obrázek 13:** Struktury vybraného retinoidu a derivátů vitamínu D. Obrázky převzaty z databáze ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)

Buňky obsahují dva odlišné cytosolické proteiny (CRABPs) schopné navázat retinoidy a regulovat hladinu retinolu v buňce. Následně retinoidy přechází do buněčného jádra, kde se váží na specifické jaderné receptory (RAR a RXR), kde působí jako tzv. ligand-dependentní regulátory transkripce.<sup>53</sup>

#### 4.7.2 Deriváty vitamínu D

Tyto látky jsou topicky užívány při léčbě lupénky. Tyto látky mají schopnost vázat se na receptory pro vitamín D a tímto způsobem pozitivně ovlivňují stav pacienta. Vykazují účinek antiproliferativní a diferenciacní v keratinolytů. Dále mají efekt protizánětlivý a imunosupresivní.<sup>45</sup>

Mechanismus účinku je založen na vazbou na nukleární receptor pro vitamín D. Jak již bylo zmíněno vykazují deriváty vitamínu D antiproliferační účinek, který je založen na kalcium dependentní transkripci genů. to co je pro ně významné je skutečnost, že tento účinek vykazují selektivně jen na rychle se dělící buňky, čímž mohou bránit přílišné tvorbě kožních buněk.<sup>45</sup>



## METODY

V následující části se zaměřím na metody studia vybraných dermatologických léčiv na modelových membránách, které jsem v rámci své bakalářské práce využívala.

### 5. Literární rešerše

Vzhledem k charakteru práce bylo třeba pro získání vstupních údajů pro výpočet chování látek na modelových membránách získat data z dostupné literatury a vhodných databází.

Prvním krokem bylo vytvoření seznamu látek, které budou v rámci této práce studovány. Pomocí dostupných informací v dermatologické literatuře jsem sestavila seznam skupin léčiv pro atopický ekzém, akné vulgaris a psoriázu, kterou jsem již představila v kapitole 4. Do seznamu jsem zahrнула jen lokálně topikálně aplikovaná léčiva na tuto onemocnění. Následně pro vytvoření vstupního souboru pro výpočet bylo třeba získat tzv. SMILES<sup>N</sup>. Pro jejich získání jsem použila databázi Drugbank<sup>54</sup>.

### 6. Výpočet chování látek na modelových membránách

Pro výpočet byl použit software od společnosti Schoedinger a od společnosti COSMOlogic<sup>O</sup>. Chování látek bylo studováno na čtyřech typech modelových membrán. Složení vybraných membrán ukazuje tabulka 4.

**Tabulka 4:** Chemické složení a stručný popis modelových membrán použitých pro studium chování vybraných léčiv (vytvořeno na základě databáze MolMeDB<sup>55</sup>: <http://molmedb.upol.cz/browse/membranes> dne 20.12.2018)

Název membrány	Chemické složení	popis
Ceramide NS bilayer	Ceramidy NS	Dvojrstva složená z ceramidů NS, které jsou v hairpin konformaci.
SC bilayer	Ceramidy NS, volné nasycené mastné kyseliny, cholesterol	Dvojrstva tvoří jednotlivé složky zastoupené v poměru 1:1:1.
DOPC bilayer	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Tyto lipidy se skládají ze dvou nenasycených řetězců kyseliny olejové
DMPC bilayer	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	Tyto lipidy se skládají ze dvou nasycených řetězců kyseliny myristové.

Výpočet samotný probíhal v devíti krocích, přičemž první kroky byly realizovány softwarem od firmy Schroedinger (balíky ligprep a macromodel) a zbylé byly provedeny pomocí softwaru od firmy COSMOlogic (balíky Turbomole 6.3 a

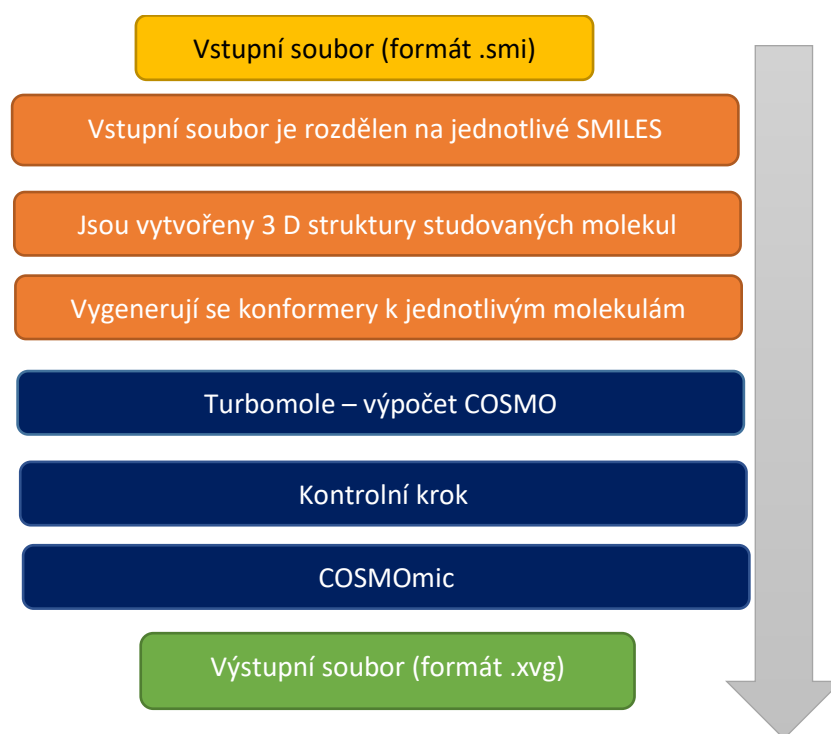
<sup>N</sup> SMILES (Simplified Molecule Input Line Entry System) je způsob reprezentace molekuly v podobě řádkového textu. Jedná se tedy o 1D reprezentaci molekuly, která je „čitelná“ pro příslušný software.

<sup>O</sup> Pro výpočet byl konkrétně použit software COSMOmic 15 a COSMOmic 18.

COSMOmic 15 a COSMOmic 18). Jednotlivé kroky výpočtu shrnuje schematicky obrázek 14. Pro každou látku byly vypočteny hodnoty deseti údajů. Ty to údaje shrnuje tabulka 5.

**Tabulka 5:** Vypočtené údaje o chování látek na modelových membránách a jejich stručný popis

	Popis
Position	Pozice ligandu na membráně
Penetration	Velikost penetrační bariéry
Water	Míra afinity ligandu <sup>P</sup> k membráně
LogK	Partiční koeficient membrána-voda
Area	Plocha ligandu
Volume	Objem ligandu
MW	Molekulová hmotnost ligandu
Resistance	Rezistence membrány proti průchodu ligandu přes membránu
Log_Perm	Permeabilitní koeficient



**Obrázek 14:** Schematické znázornění jednotlivých kroků výpočtu chování látek na modelových membránách

oranžová barva – část výpočtu realizovaná softwarem od Schroedinger, tmavě modrá – část výpočtu realizovaná softwarem od COSMOlogic

<sup>P</sup> Ligandem bude v textu práce ve vztahu k membráně označováno léčivo.

## 6.1 Výpočet profilu volné energie metodou COSMOmic

Neutrální struktury sloučenin (léčiv) byly vygenerovány ze SMILES jednotlivých léčiv s modulem LigPrep modulem z balíku Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-4<sup>56</sup>. Dalším krokem bylo vytvoření jednotlivých konformerů každého jednotlivého léčiva v rámci balíku MacroModelu<sup>56</sup> s použitím silového pole OPLS\_2005 za vakua. Pomocí smíšeného vyhledávání MCOMM/LMC2 bylo umožněno vyhledávání v modu zvaném *low-mode conformation searches* s Monte Carlo strukturní selekcí<sup>57</sup>. Pro další analýzu byly brány pouze konformery, které měly nejnižší energii v rámci 5 kcal/mol a RDMS atomů bylo alespoň 2 Å k ostatním vybraným konformerům. Každý vybraný konformer byl podroben sérií DFT/B-P/cc-TZVP za vakua a COSMO optimalizaci pomocí Turbomole 6.3<sup>58</sup> v rámci cuby4 aplikačního rámce<sup>59</sup>. Po každém optimalizačním kroku, výpočtů tzv. *single point energie* pomocí DFT/B-P/cc-TZVPD úrovně s tzv. *fine grid* byly výsledky předány dále k získání COSMO souborů pro každý jednotlivý konformer.

Struktury 15 lipidových konformerů pro každý lipid (DOPC, ceramidy NS, lignocerová kyselina a cholesterol, DMPC) byly vytvořeny z 200 ns trvajících volných molekulárně dynamických simulací. COSMO soubory byly získány stejným způsobem jako sloučeniny, použitím Turbomole 6.3. Atomová distribuce ve dvojrstvách DOPC, CER, SC a DMPC pomocí nástroje *g\_density* ze softwarového balíku Gromach.<sup>60</sup> Molekulárně dynamická simulace trvala v průměru 50 ns, během této simulace byla membrána rozdělena do 50 sekcí. Připravili jsme set konformerů sloučenin a lipidů a vypočetli jsme 15 profilů volných energií pro každé léčivo a pro každý lipidový konformer za použití COSMOmicX18.<sup>34</sup> Z průměru těchto profilů jsme získali výsledné profily a následně jsme vypočítaly diskutované parametry.

## 6.2 Parametry výpočtu

První z výše zmíněných balíků od společnosti Schroedinger– LigPrep je používán na tvorbu 3D struktury ze SMILES zápisu. Spouštěli jsme jej s nastavením, kdy vytvářel elektroneutrální struktury.<sup>61</sup>

Druhým programovým balíkem od stejného výrobce byl balík MacroModel, jehož nejdůležitější zvolené parametry pro realizované výpočty jsou shrnuty v následujících bodech. Používané hodnoty jsou posléze shrnuty v tabulce 6:

- FFLD (*Force FieLD Selection*) – Umožňuje zvolit silové pole pro daný výpočet. Zvolené silové pole bylo v případě této práce bylo OPLS\_2005.<sup>62</sup>
- SOLV (*SOLVation selection*) - Dovoluje zvolit solvatační model a solvent. Jako solvatační model byl zvolen GB/SA a jako solvent byla použita voda.<sup>63</sup>
- BDCO (*Bond Dipole CutOffs*) – Slouží pro zjednodušení výpočtu dalekodosahových elektrostatických interakcí. Přesněji umožňuje nastavit cutoff vzdálenost pro interakce náboj – dipól a interakce náboj-náboj.<sup>64</sup>

- CRMS (*Convergence RMS*<sup>Q</sup>) – Tento parametr udává geometrická kritéria, která určují, že dvě struktury jsou identické v rámci konformačního hledání či několika násobné minimalizace. Maximální energetický rozdíl pro porovnání činil 4.184 kJ/mol. Maximální vzdálenost oddělující dvě struktury, že nemohou být během konformačního porovnání považovány za stejné měla hodnotu 2 Å. Maximální rozdíl dihedrálních úhlů byl 60°. Jako porovnávací kritérium bylo nastaveno RMSD.<sup>64</sup>
- ARPK (*ARPack parameters*) – Balík, který zjednodušuje tzv. *eigen-problém*<sup>R</sup> tím, že se jej nesnaží řešit přímo, ale rozdělí jen na sadu drobnějších kroků o mnohem menší dimensionalitě problému.<sup>65</sup>
- LMC2 (*Low-Mode Conformational search for large molecules*) – Metoda používaná pro tzv. *low-mode conformation searches*<sup>57</sup>
- MCNV (*Monte Carlo Number of Variables*) – Udává počet stupňů volnosti, tedy počet torzních úhlů a počet molekul, které se mohou pohybovat v prostoru.<sup>64</sup>
- MCSS (*Monte Carlo Structure Selection*) – Umožňuje programu vybrat startovací geometrie pro metodu Monte Carlo několika různými způsoby.<sup>64</sup>
- MCOP (*Monte Carlo Options*) – Změní data zapsaná v *.log* souboru a provede geometrickou optimalizaci.<sup>64</sup>
- MSYM (use the MmSYM library) – jedná se o knihovnu, která slouží k určení mapy mezi dvěma konformery a porovná tyto konformery. Pokud se konformery výrazně neliší - zůstává jen ten, který je nejlepší.<sup>64</sup>
- CONV (*minimization CONvergence criterion*) – Minimalizuje defaultní konvergenční kritérium na hodnotu 0,05 kJ/ Å-mol<sup>64</sup>
- MINI (*MINimize the energy of a structure*) – minimalizuje energii všech struktur ve vstupním souboru.<sup>64</sup>

<sup>Q</sup> „Root Mean Square“ – odmocnina ze čtverce, používá se např. jako střední vzdálenost souboru atomů od sebe v rámci RMSD – root mean square distance.

<sup>R</sup> Eigen-problém znamená hledání neoptimálnějších podmínek popsanych jako vlastní (tzv. eigen) čísla v rámci optimalizace matice popisující vzájemné vzdálenosti atomů v molekule.

**Tabulka 6:** Konkrétní hodnoty argumentů (Arg) pro jednotlivé parametry ve výpočtu

Parametr	Arg1	Arg2	Arg3	Arg5	Arg6	Arg8	Arg9	Arg10
FFLD	14	1	0	0	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
SOLV	3	1	0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
BDCO	0	0	0	0	89,4427	99999,0000	0,0000	0,0000
CRMS	0	0	0	0	0,0000	2,0000	0,0000	2,0000
ARPK	0	300	450	20	0,0000	0,0000	0,0100	0,0010
LMC2	1000	0	0	0	0,0000	0,0000	3,0000	12,0000
NANT	0	0	0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MCNV	1	5	0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MCSS	2	0	0	0	21,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MCOP	1	0	0	1	0,0500	10,0000	0,0000	0,0000
DEMX	0	833	0	0	21,0000	42,0000	0,0000	0,0000
MSYM	0	0	0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AUOP	0	0	0	0	100,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AUTO	0	2	1	1	0,0000	-1,0000	0,0000	3,0000
CONV	2	0	0	0	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000
MINI	1	0	2500	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

## VÝSLEDKY

Následující část je zaměřena na konkrétní výsledky literární rešerše používaných léčiv a následně výpočtů jejich chování na membránách pomocí programu COSMOmic a na jejich interpretaci. Výsledky výpočtu jsou konfrontovány se skutečným použitím jednotlivých léčiv v dermatologii.

### 7. Výsledky literární rešerše léčiv

Po provedení literární rešerše jsem získala konkrétní zástupce jednotlivých skupin používaných léčiv (viz kapitola 4), k těmto zástupcům byly pro výpočet doplněny také SMILES každého z nich. Seznam obsahuje celkem 52 látek z nichž 4 jsou v dnešní lékařské praxi již nepoužívané. Výsledky literární rešerše s použitím<sup>5</sup> jednotlivých léčiv shrnuje tabulka 7.

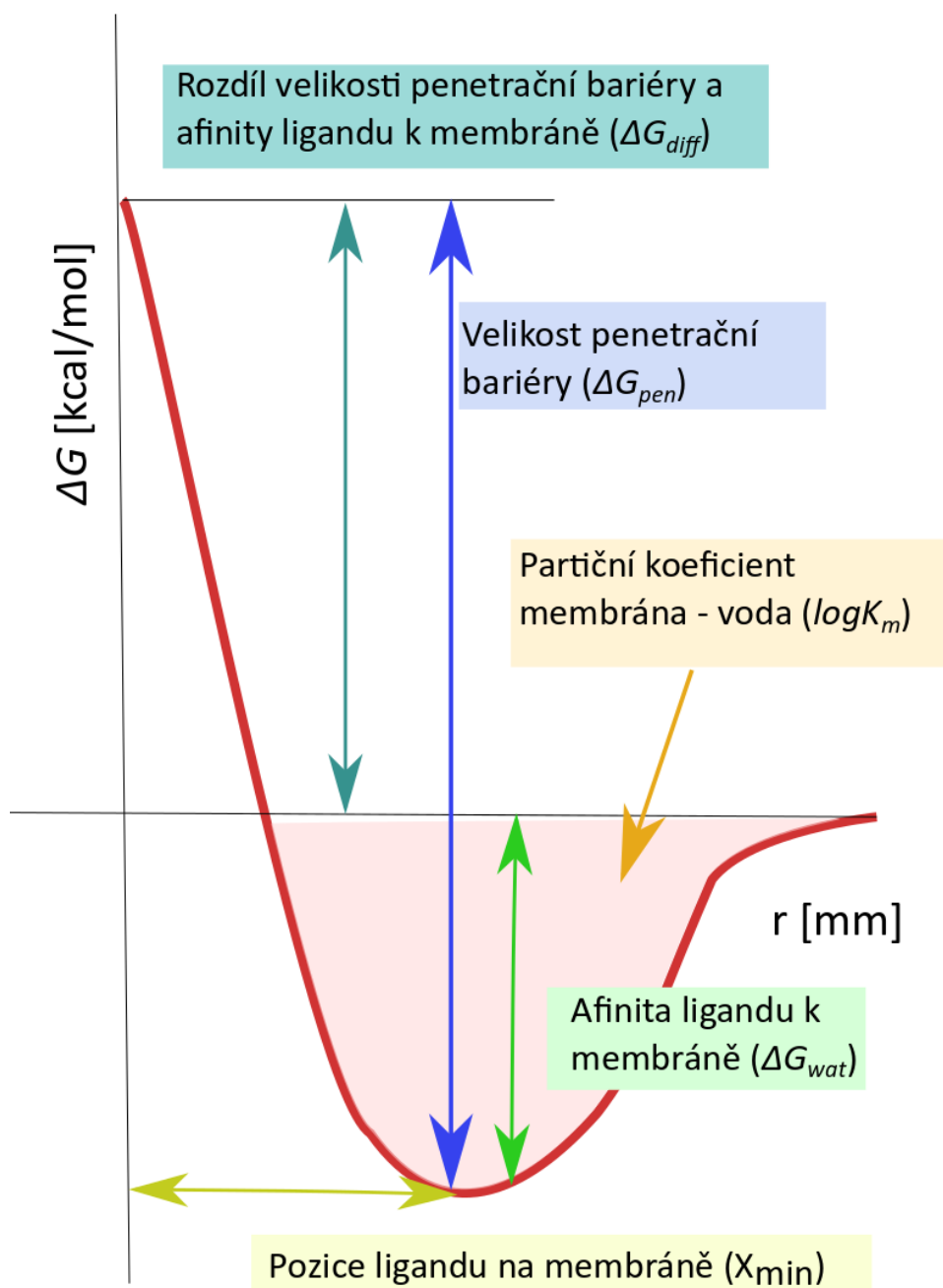
**Tabulka 7:** Výsledek literární rešerše léčiv. Léčiva jsou zařazena do skupin dle svého použití. Červeně jsou vyznačena léčiva, která se dnes již v lékařské praxi nepoužívají. V závorkách jsou uvedena další využití léčiv, pokud je mají (Sestaveno dle databáze DrugBank<sup>54</sup>)

Druh léčiva	léčivo
Antibiotika	Klindamycin, Erythromycin, Kyselina fusidová, Gentamicin, Mupirocin, Natamycin, Retapamulin, Tetracyklin, (Mecloxyklin)
Antiinfektiva	<b>Bithionol</b> , Mecloxyklin, Sulfátamid, (Klindamycin), (Kyselina fusidová), (Tetracyklin)
Protizánětlivá léčiva	Anthralin, (Pimecrolimus), (Adapalen)
Antiseptika	Chlorhexidin, Resorcinol, Triklosan
Deriváty vitamínu D	Kalcipotriol, Kalcitriol
Inhibitory kalcineurinu	Pimecrolimus, Takrolimus
Kortikosteroidy	Alklomethason, Amcinonid, Betamethason, Klobetason, Klokortolon, Desonid, Desoximetason, Diflorason, Difluokortolon, Flumethason, Fluocinolon-acetonid, <b>Flupredniden</b> , Flucatison propionát, <b>Halcinonid</b> , Hydrokortison, Methylprednisolon, Mometason, Prednikarbát, Prednisolon, Triamcilon, Ulobetasol
Keratolytika	Kyselina mléčná, Propylenglykol, Kyselina salicylová, Urea, Benzoyl peroxid, (Tazaroten)
Retinoidy	Adapalen, <b>Etretinát</b> , Isotretinoin, Tazaroten, Tretinoin
Nezařazené	Kyselina azelaová

<sup>5</sup> V případě, že by daná látka mohla být zařazena do více skupin, tak je upřednostněna jen jedna z možností. Které další skupiny by pro dané léčivo připadaly v úvahu, shrnuje (kapitola 4). Rozdělení, jak je uvedeno zde koresponduje s rozdělením léčiv, které bylo použito pro obrázky 17 a 19.

## 8. Výpočet chování léčiv na membránách

Výsledky výpočtů konkrétních údajů pro konkrétní léčiva jsou uvedeny v příloze. V následující kapitole budou prezentovány reprezentativní výsledky jednotlivých počítaných údajů. Obrázek 8 znázorňuje graficky vybrané parametry, které jsme extrahovali z profilů volné energie.



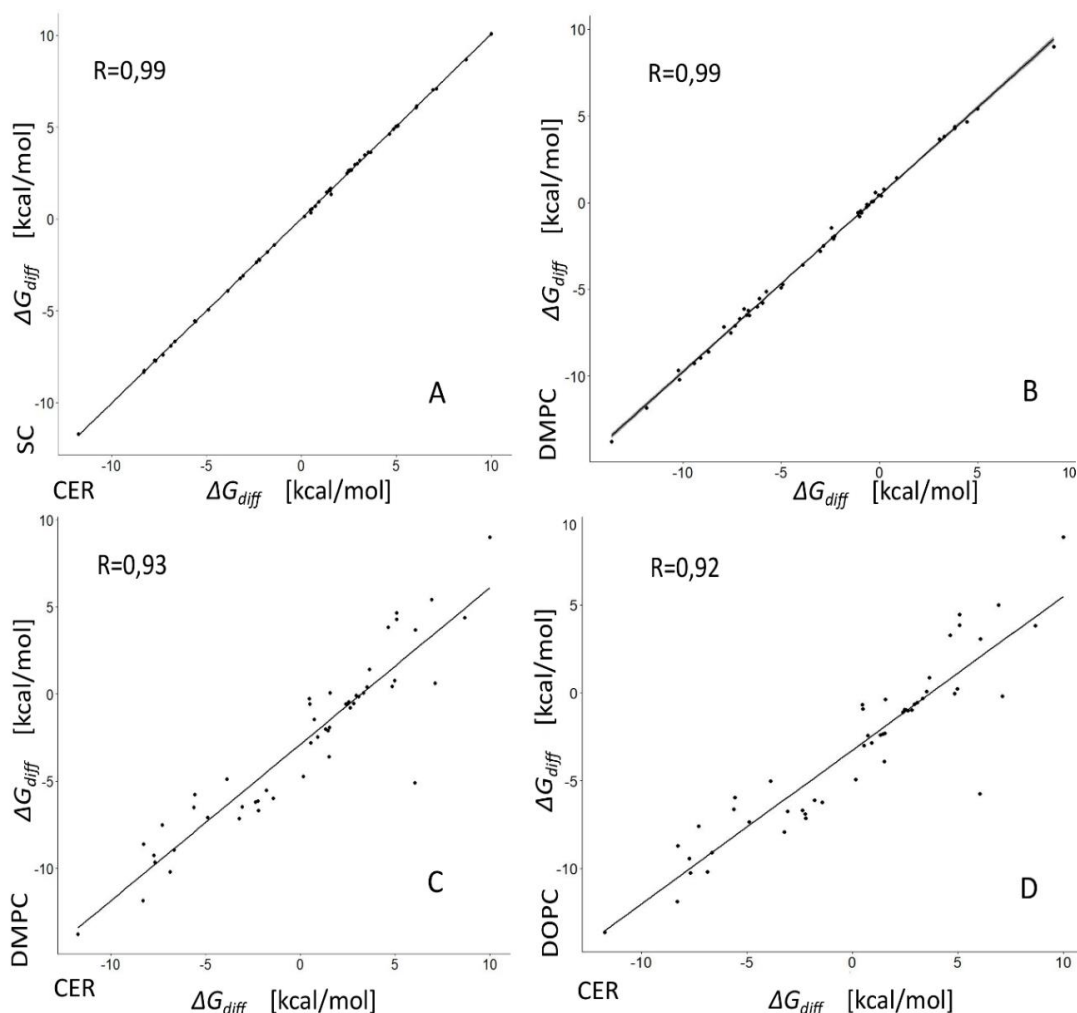
**Obrázek 15:** Grafické znázornění vybraných vypočtených údajů

## 8.1 Výpočet jednotlivých údajů o chování látek na membránách

V následujících podkapitolách budou uvedeny vybrané údaje z tabulky 5 o chování léčiv na modelových membránách.

### 8.1.1 Porovnání výsledků na jednotlivých modelových membránách

Výpočty byly realizovány celkem na čtyřech typech membrány. Popis těchto membrán je předmětem tabulky 4 v Metodách.



**Obrázek 16 :** Vzájemné porovnání vypočtených hodnot  $\Delta G_{diff}$  pro jednotlivé membrány (vytvořeno pomocí programu RStudio<sup>66</sup>)

Obecně můžeme říci, že látky membránami SC a CER léčiva procházela hůře než membránami DOPC a DMPC. Rovněž můžeme konstatovat, že rozdíl mezi membránou SC a CER v průchodu každého jednotlivého léčiva byl minimální (obrázek 9 A), to potvrzuje případ eretinátu, calcipotriolu či benzoyl peroxidu (tabulka 8). To stejné platí i pro dvojici membrány DOPC a DMPC (obrázek 9 B). Co však stejné nebylo, byla skutečnost, jak velký byl rozdíl mezi hodnotami pro membrány, které popisují kůži (SC a CER) a hodnotami vypočtenými pro modelové membrány DOPC a DMPC (obrázky 9 C a 9 D). Zde se dají najít i mimořádně velké i mimořádně malé rozdíly. Tyto skutečnosti dále ukazuje tabulka 8.



**Tabulka 8:** Vypočtené hodnoty  $\Delta G_{diff}$  pro jednotlivé membrány

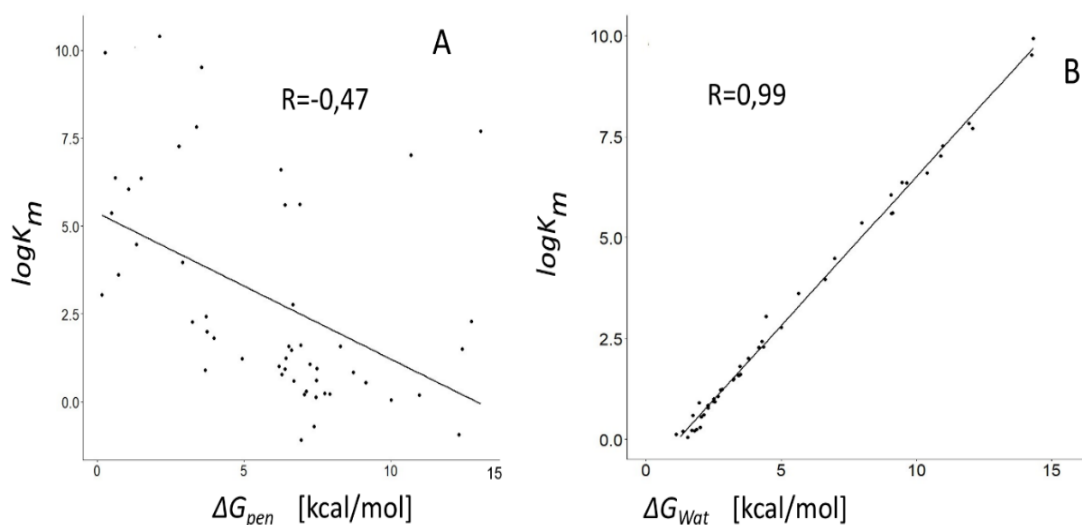
	CER $\Delta G_{diff}$ [kcal/mol]	SC $\Delta G_{diff}$ [kcal/mol]	DOPC $\Delta G_{diff}$ [kcal/mol]	DMPC $\Delta G_{diff}$ [kcal/mol]
Eretinát	-11,75	-11,72	-13,63	-13,79
Mometason	0,53	0,55	-3,01	-2,80
Calcipotriol	0,13	0,13	-4,93	-4,73
Bezoyl peroxid	-5,64	-5,57	-6,63	-6,51
Takrolimus	6,02	6,07	-5,76	-5,12
Anthralin	-5,59	-5,59	-5,95	-5,78

Například v případě zmiňovaného benzoyl peroxidu či anthralinu byly tyto rozdíly dosti malé, v případě mometasonu a calcipotriolu už činily velký rozdíl, jelikož pokud bychom chtěly průchod této látky posuzovat čistě podle těchto hodnoty, vyšlo by nám, že membránami kůže spíše neprochází, ale membránami DOPC a DMPC už zcela určitě ano. Jestliže mometason a calcipotriol dávají prostor pro diskuzi, zda membránou SC nebo CER prochází či nikoliv, takrolimus už by byl ale příkladem, kdy membránami SC a CER neprochází, ale přitom podle výsledků prochází membránou DOPC či DMPC. Hodnoty  $\Delta G_{diff}$  pro jednotlivé membrány a jejich vzájemné korelace shrnuje obrázek 9.

S ohledem na zaměření práce na průchod léčiv kůží a současně s ohledem na podobnosti výsledků mezi směsnou membránou SC a membránou z čistých ceramidů jsou všechny další uvedené výsledky uvedeny a diskutovány jen pro membránu CER.

### 8.1.2 Vzájemné vztahy mezi výsledky výpočtu

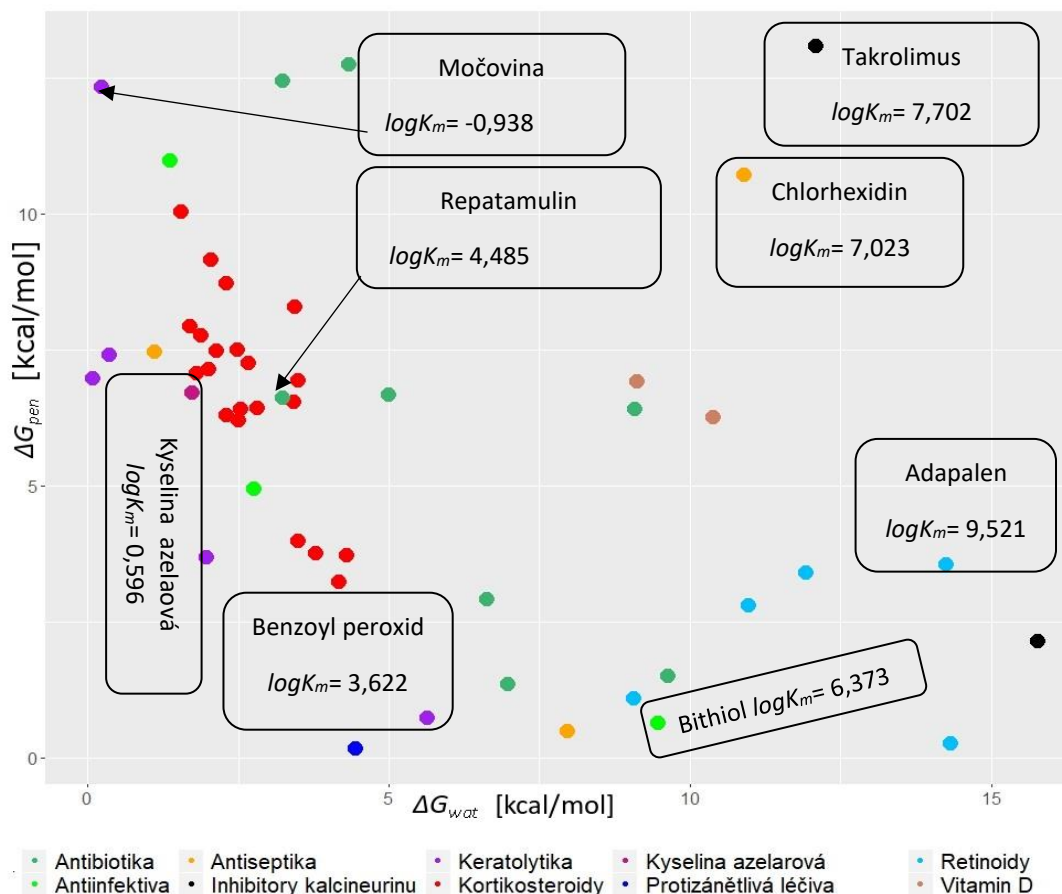
V této podkapitole bych ráda nastínila některé vzájemné vztahy, které jsou z výsledků patrné, jelikož tyto závislosti se budou poté projevovat při interpretaci chování jednotlivých léčiv na membráně. Jedny ze základních údajů, které se výpočtem pomocí výše popsané metody lze získat jsou velikost penetrační bariéry ( $\Delta G_{pen}$ ), míra afinity ligandu k membráně ( $\Delta G_{wat}$ ) a partiční koeficient membrána–voda ( $\log K_m$ ).



**Obrázek 17** : A - Korelace mezi  $\log K_m$  a  $\Delta G_{pen}$ , B - Korelace mezi  $\log K_m$  a  $\Delta G_{wat}$ , (vytvořeno pomocí programu RStudio<sup>66</sup>)

Membrána je lipofilní systém, a proto spolu hodnoty afinity ligandu k membráně ( $\Delta G_{wat}$ ) a partiční koeficient vyjádřená jako  $\log K_m$ , dobře korespondují (viz. Obrázek 17 A). Nutno dodat, že fakt že látka má velkou afinitu k membráně ještě nemusí znamenat, že membránou bude dobře procházet.

V případě hodnot penetrační bariéry ( $\Delta G_{pen}$ ) a  $\log K_m$  totiž nepozorujeme příliš velkou korelaci (viz obrázek 17 B). Nelze tedy říci, že látky s nejnižší hodnotou  $\log K_m$  nutně vykazují nejvyšší hodnotu penetrační bariéry. Takový trend na zkoumaných léčivech nepozorujeme. Data ukazují, že je sice pravdou, že látky lipofilnější povahy mají vysoké hodnoty  $\log K_m$ , a zároveň také mají velkou hodnotu  $\Delta G_{wat}$ , ale nelze říci že nutně musí vykazovat malé penetrační bariéry  $\Delta G_{pen}$ , tyto skutečnosti pro vybrané látky ilustruje obrázek 18. Na příkladu takrolimu vidíme, že se jedná o látku s velkou afinitou k membráně ( $\Delta G_{wat} = 12,085$  kcal/mol) a rovněž se jedná o látku lipofilní ( $\log K_m = 7,702$ ), nicméně velká je i hodnota jeho penetrační bariéry ( $\Delta G_{pen} = 13,077$  kcal/mol). Takrolimus má podobnou hodnotu penetrační bariéry jakou vyazuje i mnohem polárnější močovina ( $\Delta G_{pen} = 12,326$  kcal/mol).

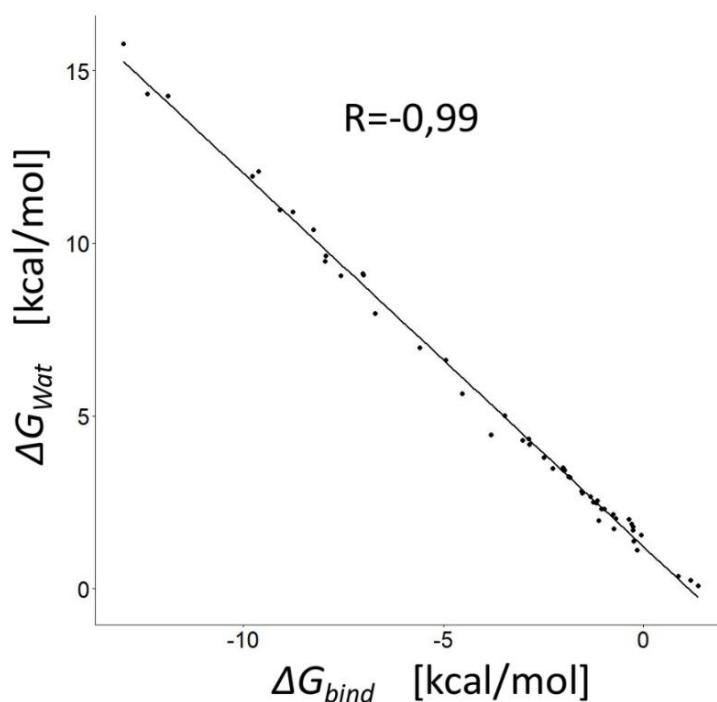


**Obrázek 18:** Grafické znázornění vybraných vypočtených údajů pro míru afinity ligandu k membráně ( $\Delta G_{wat}$ ) a velikost penetrační bariéry ( $\Delta G_{pen}$ ) pro membránu ceramidů (vytvořeno pomocí programu RStudio<sup>66</sup>)

Z hodnoty partičního koeficientu  $\log K_m$  lze vypočítat hodnotu standardní vazebné energie  $\Delta G_{bind}$  dle rovnice 12.

$$\Delta G_{bind} = -RT \ln K_m \quad (5)$$

Ve vztahu figuruje  $R$ , což je univerzální plynová konstanta, a  $T$  je termodynamická teplota. Jelikož předchozí obrázek ukazuje, že  $\log K_m$  a  $\Delta G_{wat}$  spolu úzce souvisí, tak se nabízí otázka, jak spolu budou souviset hodnoty standardní vazebné energie a afinita ligandu k membráně. Korelaci mezi hodnotami  $\Delta G_{bind}$  a  $\Delta G_{wat}$  ukazuje obrázek 18.



**Obrázek 19:** Korelace mezi hodnotami standardní vazebné energie  $\Delta G_{bind}$  a partičním koeficientem membrána – voda  $\log K_m$  (vytvořeno pomocí programu RStudio<sup>66</sup>)

Z obrázku 19 je zjevné, že míra vazby látky do membrány  $\Delta G_{bind}$  je dominantně určena hloubkou energetického minima v membráně  $\Delta G_{wat}$ . A právě proto tuto hodnotu můžeme používat jako hodnotu afinity látky vůči membráně.

### 8.1.3 Průchod léčiva membránou

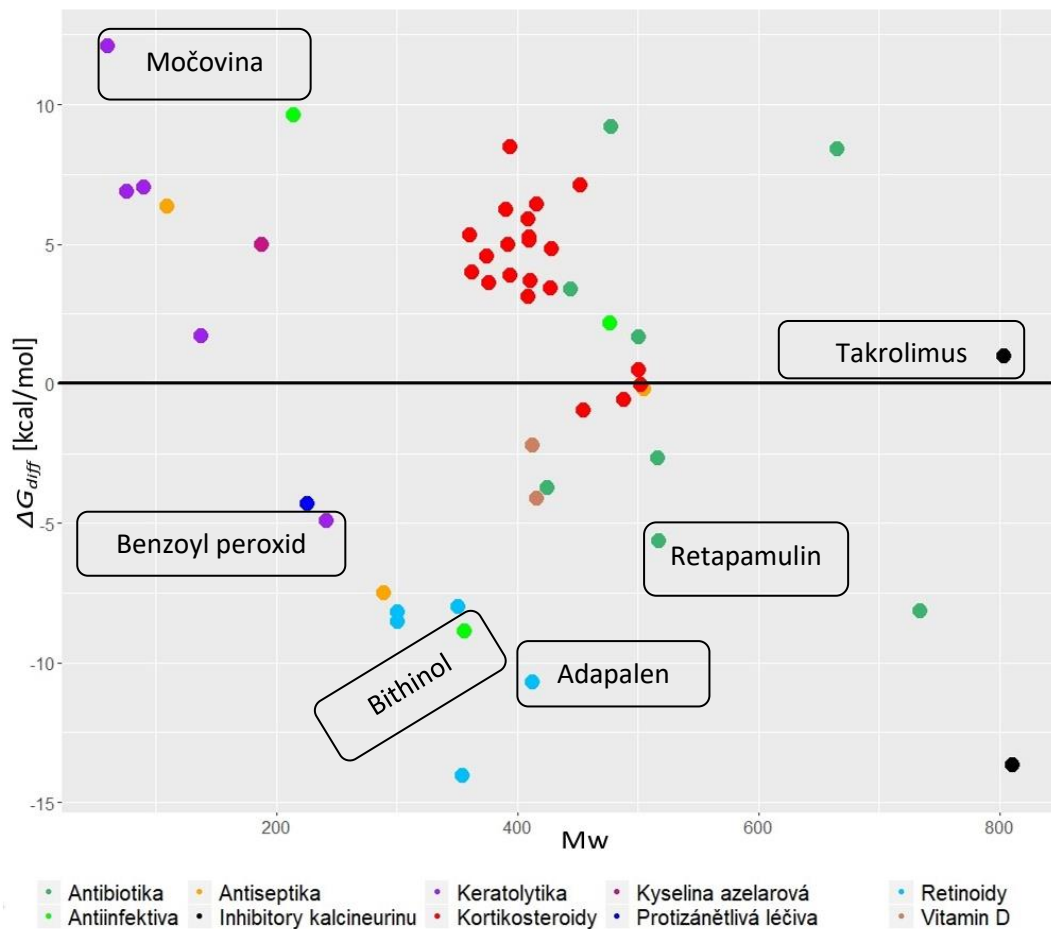
Pokud chceme určit, jestli konkrétní ligand membránou prochází či nikoliv, tak k tomu lze využít rozdíl mezi hodnotou penetrační bariéry a hodnoty afinity ligandu k membráně. Jak ukazuje rovnice 13. Nutno podotknout, že tento vztah je velmi zjednodušující a je relevantním ukazatelem pouze za stavu, kdy je membrána nasycena ligandem.

$$\Delta G_{diff} = \Delta G_{pen} - \Delta G_{wat} \quad (6)$$

Vzhledem k hodnotám, které zástupci léčiv nabývali v míře afinity i velikosti penetrační bariéry můžeme pozorovat tři možné skupiny výsledků.

- $\Delta G_{diff} < 0$ : látka membránou prochází, jelikož má penetrační bariéru menší než hodnotu své afinity k membráně. (v případě velké afinity k membráně nicméně látka může být membránou zadržena)
- $\Delta G_{diff} > 0$ : látka membránou neprochází, jelikož její penetrační bariéra je větší než afinita k membráně.

- $\Delta G_{diff} \approx 0$ : látka membránou pravděpodobně prochází, ale záleží na afinitě látky k membráně, zda se látka pouze nezachytí do membrány



**Obrázek 20:** Závislost průchodu látky membránou ceramidů (vyjádřeno pomocí  $\Delta G_{diff}$ ) na molekulové hmotnosti látky (MW [Dalton]) (vytvořeno pomocí programu RStudio<sup>66</sup>)

Obrázek 20 ukazuje, zda daný ligand membránou prochází. Abychom byli schopni posoudit kvalitu našeho výpočtu je třeba výsledky COSMOmicu konfrontovat se realitou. Bohužel experimentálně měřené permeabilitní koeficienty, které by na tyto otázky mohly rovněž odpovědět, jsou pro tyto látky často nedostupné. Proto byly na kontrolu výsledků výpočtů použity informace z literatury např. vazba na určité receptory, mechanismus účinku. Tyto informace dokázaly dát zevrubně i bez znalosti konkrétních experimentálních hodnot pro dané látky odpověď na to, zdali výsledek výpočtu pro danou látku odpovídá realitě.

Během porovnávání očekávaného chování dle literatury<sup>†</sup> a výsledků výpočtu bylo zjištěno, že pro některé ligandy COSMOmic poskytoval výsledky zdánlivě v rozporu s realitou. Jednalo se o např. retapamulin. Retapamulin je topické dermatologické

<sup>†</sup> Podstatné informace pro jednotlivé skupiny látek pro tuto práci, které byly získány z literatury a jsou shrnuty spolu s obecnými principy, které budou pro interpretaci použity v kapitole 4.

antibiotikum a jako takové má hubit bakterie na povrchu kůže, kam je aplikováno. Je zcela nežádoucí, aby procházelo do membrány *SC*. Přesto z rozdílů penetrační bariéry a afinity k membráně dostáváme hodnotu  $\Delta G_{diff} = -5,635$  kcal/mol, tedy dostáváme zápornou hodnotu, která značí průchod retapamulinu membránou, což může naznačovat prostupnost retapamulinu kůží. Navíc jak lze vyčíst z obrázku 13, tato látka není jediné antibiotikum, které podobný výsledek vykazuje. Podobně jako antiinfektivum bithinol, který podle výpočtu membránou prochází, ale procházet ideálně nemá.

Opačný problém pozorujeme v případě takrolimu, který patří mezi inhibitory kalcineurinu a jako takový musí procházet velmi dobře membránou *SC*. Dle výpočtu ale neprochází. Podobně je na tom celá široká skupina kortikosteroidů, pro které rovněž platí, že musí procházet membránou, neboť mají cíle uvnitř buněk.

Nicméně vedlejší účinky jednotlivých látek naznačují, že *SC* prochází i když nemají. Tyto skutečnosti pro vybraná léčiva ukazuje tabulka 9. Z ní je patrné, že antibiotika retapamulin, klindamycin a antiinfektivum bithinol, způsobují s různou četností vedlejší účinky, které svědčí o tom, že membránou prochází, jinak by je nemohly způsobovat. Takrolimus, který podle výsledků neprochází kůží, způsobuje vedlejší účinky svědčící o opaku.

**Tabulka 9:** Vybrané nejčastější nežádoucí účinky některých léčiv dle databáze SIDER<sup>67</sup> a TOXNET<sup>68</sup>

Léčivo	Některé nejčastější nežádoucí účinky
Retapamulin	bolest hlavy ,průjem, nevolnost <sup>69</sup>
Klindamycin	Akné, erythrema, mastná pleť <sup>70</sup>
Bithinol	Průjem, nevolnost <sup>71</sup>
Takrolimus	Zvýšení triacylglycerolů v krvi, zvýšený cholesterol v krvi, zvýšený krevní tlak <sup>72</sup>

Navíc jak ukazuje tabulka 10, pokud seřadíme látky podle jejich  $\log K_m$  od nejmenšího po největší, získáme podobné pořadí pro experimentálně získané  $\log P_{perm}$ , tedy z tohoto zjištění lze formovat, že látky polárnější mají obecně menší hodnotu permeačních koeficientů.

**Tabulka 10:** Experimentálně stanovené  $\log_{Perm}$  z databáze MolMeDB<sup>55</sup> ve třech různých uspořádání (PAMPA/skin, PAMPA/GENER a CACO) a vypočteného partiční koeficientu membrána - voda pro membránu CER metodou COSMOmic18

Léčivo	PAMPA/skin $\log_{Perm}$ [cm/s]	PAMPA/GENER $\log_{Perm}$ [cm/s]	CACO $\log_{Perm}$ [cm/s]	$\log K_m$
Betamethason	-5,84			0,947
Hydrokortizol	-5,94	-5,45	-4,85	0,783
Prednisolon		-5,23		0,605
Triamcilon	-6,24			0,053
Kyselina salicylová	-5,92		-4,66	0,904
Tetracyklin			-5,42	1,469
Resorcinol	-5,62			0,13
Urea			-5,34	-0,938

Na druhou stranu, z obrázku 13 je patrné, že pro určité látky ba i celé skupiny léčiv výsledky výpočtu velmi dobře kopírují realitu. Z celých skupin se jedná např. o retinoidy a deriváty vitamínu D.

Nabízí se tedy otázka, proč pro některé látky výpočet odpovídá skutečnosti a pro jiné se liší od předpokládaného? Pokud se budeme držet striktně teorie o hydro/lipofilicitě léčiva, která je uvedena v tabulce 3, tak je možné najít částečné zdůvodnění nesrovnalostí s dermatologickou praxí.

Náš výpočet využívající program COSMOmic používal vodu jako solvent, ze kterého ligand vstupoval do membrány. Potíž nastává v tom, že pokud máme takto extrémně hydrofilní prostředí (vodu jako vehikulum) může docházet k tomu, že hydrofilnější látky, které již tak mají malou afinitu k lipofilní membráně, nebudou ochotné vůbec procházet, protože nebudou „mít důvod“ opouštět vodnou fázi. Ze současných zjištění lze usoudit, že pokud chceme výpočet více přiblížit realitě bylo by nutné zvolit pro výpočet solvent, který bude více reprezentovat chemické vlastnosti daného typu vehikula, které se v dermatologii pro daný účel a pro dané léčivo používá.

Dalším možným důvodem by mohlo být, že náš výpočet používal gelovou ceramidovou dvouvrstvu jakožto model nenarušené membrány kůže. Nicméně kůže u některých chorob (např. u AD) má narušenou bariérovou funkci, a tak touto narušenou membránou mohou nejspíše látky procházet i tehdy, kdy by nenarušenou kůží procházely pouze obtížně. Nabízí se to například u kortikosteroidů. Tento efekt by mohl vést také k samořízení dávky léčiva.

#### 8.1.4 Velikost energetických bariér léčiv při průchodu membránou

V následujícím textu se zaměřím na vztah mezi strukturou a kinetikou léčiv na membráně ceramidů v nenasyceném stavu. V nasyceném stavu lze použít hodnotu  $\Delta G_{diff}$ , která je popsána ve výsledcích v předchozí kapitole.

Celkovou rychlostní konstantu lze rozdělit do tří dílčích konstant označovaných jako  $k_{in}$ ,  $k_{flip}$  a  $k_{out}$ . Konstanta  $k_{in}$  odpovídá vstupu ligandu do membrány. Konstanta  $k_{flip}$

odpovídá kroku, kdy se ligand nachází v hydrofobní části membrány a přechází z jedné vrstvy do druhé. Konstanta  $k_{out}$  se uplatňuje při výstupu léčiva z membrány.<sup>73</sup>

Pokud zanedbáme difuzi je možné připodobnit kinetiku prostupu látky membránou ke kinetice chemických reakcí, tak jak je popisuje Eyringova rovnice, která je vyjádřena rovnicí 14,

$$k = \left( \frac{K_B T}{h} \right) \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (7)$$

kde  $k$  je rychlostní konstanta,  $K_B$  Boltzmannova konstanta,  $T$  termodynamická teplota,  $h$  Planckova konstanta,  $\Delta G^\ddagger$  aktivační Gibsova energie a  $R$  univerzální plynová konstanta.

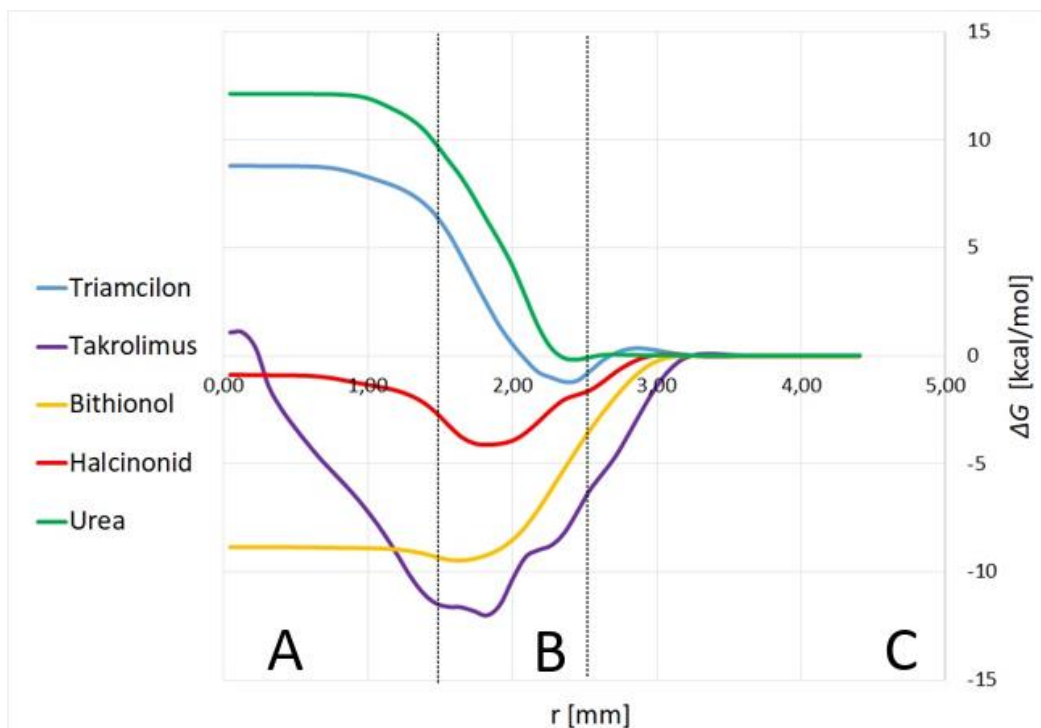
V případě prostupu látek membránami budeme uvažovat, že rychlostní konstanta  $k_{flip}$  bude odpovídat  $\Delta G_{pen}$  a konstanta  $k_{out}$  bude odpovídat  $\Delta G_{wat}$ . Pomocí těchto známých hodnot můžeme určit rychlost limitující krok, tedy nejpomalejší krok při prostupu látky membránou a rozřadit látky dle jejich chování z tohoto hlediska (viz tabulka 11).

**Tabulka 11:** Kinetické parametry vybraných léčiv

Druh léčiva	léčivo	$\Delta G_{pen} \sim k_{flip}$	$\Delta G_{wat} \sim k_{out}$
Inhibitor kalcineurinu	Takrolimus	13,077	12,085
Keratolytikum	Urea	12,326	0,234
Antiinfektivum	Bithionol	0,624	9,476
Kortikosteroid	Triamcilon	10,025	1,547
Kortikosteroid	Halcinonid	3,236	4,174

V případě takrolimu a halcinonidu vidíme, že rychlostní konstanty v hydrofobní části i při výstupu tohoto léčiva z membrány jsou zhruba stejně velké. Na příkladech močoviny a triamcilonu pozorujeme, že nejpomalejším krokem bude průnik hydrofobními částmi membrány. Posledním příkladem je bithionol, pro který je rychlost limitujícím krokem krok, kdy jeho molekula opouští membránu. Tabulka 11 ukazuje, nejvyšší a nejnižší hodnoty pro jednotlivé energetické bariéry, tedy pro které látky je daný krok rychlost limitující, a pro které naopak ne. Graficky poté tyto informace ukazuje obrázek 21 na profilech volné energie těchto látek.





**Obrázek 21:** Profil volné energie vybraných léčiv pro průchodu ze středu membrány CER do vody.

A – nepolární část membrány, B – polární část membrány, C – voda

V tabulce 12 vidíme nejvyšší a nejnižší hodnoty energetických bariér, které byly v rámci práce vypočteny. Můžeme tu pozorovat jisté trendy ve skupinách léčiv.

**Tabulka 12:** Srovnání prvních tří nejnižších a nejvyšších hodnot energetických bariér při průchodu léčiva membránou CER

$\Delta G_{pen} \sim k_{flip}$	$\Delta G_{wat} \sim k_{out}$	$\Delta G_{diff}$	
Anthralin (0,157 kcal/mol)	Propylenglykol (0,083 kcal/mol)	Etretinát (-14,058 kcal/mol)	Nejnižší hodnoty energetických bariér
Etretinát (0,264 kcal/mol)	Urea (0,234 kcal/mol)	Pimecrolimus (-13,656 kcal/mol)	
Triklosan (0,491 kcal/mol)	Kyselina mléčná (0,368 kcal/mol)	Adapalen (-10,709 kcal/mol)	
Gentamicin (12,437 kcal/mol)	Adapalen (14,265 kcal/mol)	Gentamicin (9,191 kcal/mol)	Nejvyšší hodnoty energetických bariér
Natamycin (12,751 kcal/mol)	Etretinát (14,322 kcal/mol)	Sulfátamid (9,607 kcal/mol)	
Takrolimus (13,077 kcal/mol)	Pimecrolimus (15,785 kcal/mol)	Urea (12,092 kcal/mol)	

V prostředním sloupci tabulky 12 můžeme vidět, že nejmenší hodnoty  $\Delta G_{wat}$  vykazují některá keratolytika (urea, propylenglykol a kyselina mléčná). Pokud to spojíme s rychlostními konstantami můžeme říci, že opustit membránu pro tyto látky rozhodně nebude nejpomalejším krokem. Naopak jejich hodnoty bariéry  $\Delta G_{pen}$  ukazují, že pro ně přechod přes lipofilní část membrány bude rychlost limitující.

**Tabulka 13:** Porovnání velikostí energetických bariér rychlost určujících kroků při průchodu keratolytika membránou CER

Keratolytikum	$\Delta G_{pen} \sim k_{flip}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{wat} \sim k_{out}$ [kcal/mol]	$\log K_m$
Propylenglykol	6,96	0,083	-1,087
Urea	12,326	0,234	-0,938
Kyselina mléčná	7,395	0,368	-0,7
Kyselina salicylová	3,677	3,295	0,904
Benzoylperoxid	0,727	5,646	3,622

Jak ilustruje tabulka 13, toto ovšem neplatí pro zbylá keratolytika (benzoylperoxid a kyselina salicylová), jelikož benzoylperoxid má naopak bariéru  $\Delta G_{wat}$  větší a u kyseliny salicylové jsou hodnoty obou bariér takřka vyrovnány. Tyto výsledky souvisí s lipofilitou dané látky – pro polární látky představuje membrána bariéru především pro přechod přes nepolární část.

Nejvyšších hodnoty  $\Delta G_{wat}$  v prostředním sloupci tabulky 12 ukazují dva retinoidy (adapalen a etretinát) a jeden inhibitor kalcineurinu (pimecrolimus). Pokud se podíváme na celou skupinu retinoidů, tak vidíme, že obecně pro všechny zástupce této skupiny platí, že rychlost limitující krok v jejich případě nastává při opouštění membrány (viz tabulka 14).

**Tabulka 14:** Porovnání velikostí energetických bariér rychlost určujících kroků při průchodu retinoidů membránou CER

Retinoidy	$\Delta G_{pen} \sim k_{flip}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{wat} \sim k_{out}$ [kcal/mol]	$\log K_m$
Etretinát	0,264	14,322	9,931
Adapalen	3,556	14,265	9,521
Tretionin	3,391	11,937	7,828
Izotretionin	2,792	10,973	7,272
Tazaroten	1,08	9,063	6,055

Pro dvojici antibiotik (gentamicin a natamycin) a inhibitor kalcineurinu (tacrolimus) nacházíme jedny z nejvyšších penetračních bariér. Tedy rychlost určujícím krokem pro ně je přechod přes lipofilní část membrány. Jak vidíme z následující tabulky 15, antibiotika z hlediska velikosti energetických bariér nejsou zdaleka tak homogenní skupinou jako skupiny předchozí. Čtyři zástupci mají nejvyšší energetickou bariéru při průchodu lipofilní částí membrány a čtyři ji mají nejvyšší při opouštění membrány.

**Tabulka 15:** Porovnání velikostí energetických bariér rychlost určujících kroků při průchodu antibiotik membránou CER

Antibiotika	$\Delta G_{pen} \sim k_{flip}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{wat} \sim k_{out}$ [kcal/mol]	$\log K_m$
Erythromycin	1,5	9,646	6,357
Retapamulin	1,347	6,972	4,485
Klindamycin	2,906	6,627	3,964
Kyselina fusidová	6,408	9,088	5,601
Mupirocin	6,67	5,006	2,771
Tetracycline	6,616	3,23	1,469
Natamycin	12,751	4,339	2,294
Gentamicin	12,437	3,246	1,502

Výsledky studia chování léčiv na modelových membránách ukazují, že průchod léčiva je závislý na chemických vlastnostech léčiva a na chemickém složení membrány. Obecně lze říci, že membrána kůže je obtížněji průchozí než ostatní biologické membrány. Z vlastností léčiva je důležitá jeho lipofilita, která velmi dobře koreluje s jeho afinitou k membráně a která ovlivňuje i průchod léčiva.

Pro studium chování léčiva na membráně je navíc vhodné znát rychlost limitující při jeho průchodu membránou, tedy lokalizovat, kde na membráně má ligand nejvyšší energetickou bariéru.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo studovat chování vybraných dermatologických léčiv na modelových membránách. Konkrétně se jednalo vybraná o topicky aplikovaná léčiva na akné, lupénku a atopický ekzém, která se dnes v lékařské praxi používají nebo se používala dříve.

V textu práce byla věnována pozornost literární rešerši v oblasti chování těchto léčiv na *stratu corneou*. Především se to týkalo informací, které dokázaly dát odpověď na to, jaké je žádoucí chování léčiv na kůži, např. látka má nebo nemá pronikat hlouběji do kůže za svým cílem. Cílem rešerše o chování léčiv bylo získat alespoň hrubou představu o skutečném chování léčiv na kůži, se kterou by bylo možno konfrontovat výpočty prováděné programem COSMOmic.

Jelikož se jedná o onemocnění kůže, byla jako modelová membrána nejvíce používána membrána ceramidů (CER), která napodobuje lipidovou matici *strata cornea*. Lipidová matrice se uplatňuje při průniku xenobiotika do organismu. Nicméně pro porovnání chování těchto látek na membránách obecně byly výpočty realizovány také na směsné membráně, tvořené ceramidy, volnými mastnými kyselinami a cholesterolem v ekvimolárním poměru (SC), dále pak na membránách tvořených dioleoylfosfatidylcholinem (DOPC) a dimyristoylfosfatidylcholinem (DMPC). Bylo zjištěno, že membrány CER a SC jsou obecně méně průchozí pro léčiva než membrány DOPC či DMPC. Rovněž výsledky pro membrány CER a SC si byly velice podobné, stejně tak si byly číselně podobné výsledky pro membrány DOPC a DMPC. Na základě těchto zjištění jsme se posléze zaměřili pouze na membránu CER.

U jednotlivých látek jsme posuzovali několik veličin popisujících interakce s membránou: velikost penetrační bariéry ( $\Delta G_{pen}$ ), hloubka energetického minima látky na membráně ( $\Delta G_{wat}$ ) a logaritmus partičního koeficientu membrána – voda ( $\log K_m$ ) a jejich vzájemné vztahy. Z těchto vztahů je významný závěr, že  $\Delta G_{wat}$  a  $\log K_m$  spolu velmi dobře korelují, a to napříč chemickou různorodostí léčiv, takže  $\Delta G_{wat}$  může sloužit jako míra afinity léčiva k membráně. Poté jsme se zaměřili na zjednodušený způsob, jak rozhodnout, zda látka prochází či neprochází membránou pomocí hodnoty  $\Delta G_{diff}$ . Tato energie určuje energetickou bariéru pro prostup látky za situace, že je membrána léčivem nasycena. Takže výsledky, které byly určeny touto hodnotou byly často v rozporu s očekáváními dle literatury.

Na energie  $\Delta G_{pen}$  a  $\Delta G_{wat}$  je možno pohlížet také jako na bariéry pro rychlost limitující kroky čili bylo možno rozdělit léčiva podle toho, který krok je pro ně limitující pro průchod membránou. Ukazuje se, že jednotlivé skupiny léčiv se liší. Výhodou tohoto přístupu je, že lépe popisuje situaci za stavu, že membrána není léčivem zcela nasycena.

Nicméně všechny výsledky byly metodou COSMOmic vypočteny s několika zjednodušeními. Především jsme počítali pouze s přestupem léčiva z vody do membrány. Je třeba podotknout, že vehikula dermatologických léčiv nejsou vždy

hydrofilní. Rovněž také není většina dermatologických přípravků tvořena jen vehikulem a účinnou látkou. Dále je zapotřebí zmínit, že jsme studovali model neporušené membrány, a tudíž možná příliš neprostupný pro některé typy léčiv. Také jsme studovali membrány jen za stavu s nekonečným rozředěním – tedy jedinou molekulou léčiva. Proto je výzvou do budoucna zrealizovat obdobný výpočet bez těchto omezení.

## SUMMARY

The main aim of this thesis was to study the behaviour of dermatologically active compounds on model membranes. We focus on topical-applied dermatologicals for treatment of atopic dermatitis, psoriasis and acne vulgaris which are or were used in medical practice.

We performed literature review about behaviour of dermatologicals on *stratum corneum*, especially about desirable or undesirable permeation into the skin for achievement their target. The aim of the literature review was to get as detailed as possible view into about real behaviour of dermatologicals on the skin. Results of literature review were compared with our COSMOmic calculations.

Lipid matrix of *stratum corneum* is important for transport of xenobiotics in organisms. To model the lipid matrix of *stratum corneum*, we used bilayers consisting of different lipids. For comparison behaviour of drugs on skin we have used ceramide (CER) and mixed model skin membrane which consists of ceramides, free fatty acids and cholesterol in equal ratio (SC). To gain further insight, we have included also phosphatidylcholine membranes – dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) to model cell membranes. At first, we focused on each model membrane and its relationship with drugs. The SC and CER membranes have shown to be less permeable than DOPC and DMPC membranes. Moreover, SC and CER have shown to produce similar results to each other (DMPC and DOPC as well), so for the sake of simplicity we have further used CER membrane.

Next, we paid attention to simplified description of drug interactions with membrane. We studied penetration barrier ( $\Delta G_{pen}$ ), minima of the free energy profile in membrane ( $\Delta G_{wat}$ ) and logarithm of partition coefficient membrane – water ( $\log K_m$ ) and their mutual relationships. Very important conclusion of these mutual relationships is fact that  $\Delta G_{wat}$  and  $\log K_m$  are very good correlated notwithstanding chemical diversity of the drugs. As a result,  $\Delta G_{wat}$  can serve as a measure of the affinity of drug towards membrane. Further have used free energy difference between water phase and centre of CER membrane ( $\Delta G_{diff}$ ) as a sole predictor for permeation, even though this energy is mainly relevant for saturated membrane scenario. Hence the results were often incompatible with expected behaviour of drugs according to our literature review.

If we regard the energies  $\Delta G_{pen}$  and  $\Delta G_{wat}$  as the barriers of rate-limiting steps, we were able to classify drugs according to which step for each drug is the most complicated during permeation event across biological membrane. The rate-limiting step is sometimes typical for all groups of drugs. This approach is relevant also for unsaturated membrane scenario.

As the results in this bachelor thesis were calculated with COSMOmic method, we have introduced multiple simplifications. Firstly, the calculation was set up for drugs permeating from water into membrane, however dermatological vehicles are not always hydrophilic, also most of dermatological products do not consist of just active

ingredient and vehicle. Further we have studied the drugs on model of intact membrane, which would be disrupted in skin disease and lastly, we have studied the drugs in infinite dilution scenario – with one drug molecule. All these limitations should be considered and challenged upon future calculations.

## REFERENCE

1. Polášková, S. Epidermální bariéra a její význam u zdravé a atopické kůže. *Pediatr. pro Praxi* **15**, 210–212 (2014).
2. Benson, H. & Watkinson, A. Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice. in (eds. Watkinson, A. & Benson, H.) 3–22 (A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2012).
3. Machado, M., Salgado, T. M., Hadgraft, J. & Lane, M. E. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *Int. J. Pharm.* **384**, 73–77 (2010).
4. Vávrová Kateřina, H. A. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. Lékař. 1*, 8–11 (2005).
5. van Smeden, J. *et al.* The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 295–313 (2014).
6. Vávrová, K., Kováčik Andrej & Opálka, L. Ceramides in the skin barrier. *Eur. Pharm. J.* **64**, 1–8 (2017).
7. Kotingová, L., Borská, L. & Fiala, Z. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chem. List.* **103**, 533–539 (2009).
8. Swartzendruber, D., Wertz, P., Kitko, D., Madison, K. & Downing, D. Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 251–257 (1989).
9. Bouwstra, J. A., Dubbelaar, F. E. R., Gooris, G. S. & Ponc, M. The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm. Venereol.* 23–30 (2000).
10. Norlén, L. Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 830–836 (2001).
11. Kiselev, M. A. Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the stratum corneum. *Crystallogr. Reports* **52**, 525–528 (2007).
12. Kessner, D., Ruettinger, A., Kiselev, M. A., Wartewig, S. & Neubert, R. H. H. Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure: A Review Part 2: Stratum Corneum Lipid Model System. *Ski. Pharmacol Physiol* **21**, 58–74 (2008).
13. Schroeter, A., Kiselev, M. A., Hauß, T., Dante, S. & Neubert, R. H. H. Evidence of free fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes based on ceramide [AP] by deuterium labelling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 2194–2203 (2009).
14. Skoglund, U. *et al.* The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2215–2225 (2012).
15. Lundborg, M. *et al.* Human skin barrier structure and function analyzed by cryo-EM and molecular dynamics simulation. *J. Struct. Biol.* **203**, 149–161 (2018).
16. Trommer, H. & Neubert, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol. Physiol.* **19**, 106–121 (2006).
17. Lucie, M. & Jarešová, R. Atopický ekzém a pimecrolimus. *Pediatr. pro Praxi* **7**, 156–157 (2013).
18. Nevalová, Z. Atopický ekzém – teorie i praktické rady. *Pediatr. pro Praxi* **9**, 104–109 (2015).
19. Benáková, N. Léčba atopické dermatitidy / ekzému u dospělých. *Med. Pro Praxi* **7**, 221–228 (2010).
20. Obrovská, M. Volně prodejné přípravky na léčbu akné vulgaris. *Pediatr. pro Praxi* **9**, 182–184 (2015).
21. Vantuchová, Y. Lokální léčba akné. *Pediatr. pro Praxi* **15**, 344–346 (2014).
22. Pappas, A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* **1**, 72–76 (2009).
23. Nováková, K. Modelové biologické membrány: Jejich charakterizace a využití. *Chem. List.* **109**, 166–175 (2015).
24. Murry, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. *Harperova ilustrovaná biochemie.* (Galén, 2009).



25. Gaur, R., Mishra, L. & Sen Gupta, S. K. Diffusion and Transport of Molecules In Living Cells. in *Modelling and Simulation of Diffusive Processes* 27–49 (Springer International Publishing, 2014). doi:10.1007/978-3-319-05657-9\_2
26. Friedman, M. Principles and Models of Biological Transport. in *Principles and Models of Biological Transport* 33–34 (Springer New York, 2008). doi:10.1007/978-3-662-02469-0
27. Lincová Dagmar, F. H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. (Galén, 2007).
28. National Centre for the Replacement Refinement and Reduction of Animal in Research. The 3Rs. Available at: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>. (Accessed: 23rd March 2019)
29. Berka, P., Roh, J. & Pala, K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **29**, 15624–15633 (2013).
30. Mojumdar, E. H. et al. Stratum corneum lipid matrix: Location of acyl ceramide and cholesterol in the unit cell of the long periodicity phase. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 1926–1934 (2016).
31. Pullmannová, P. et al. Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long ( C16 ) and very long ( C24 ) acyl chains. *Biophys chem* **224**, 20–31 (2017).
32. Kovác, A. et al. Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum. *J. Colloid Interface Sci.* **535**, 227–238 (2019).
33. Leach Andrew R. Molecular modelling. in *Molecular Modelling Principles and Application* 352–409 (Pearson Education Limited, 2001).
34. 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* **112**, 12148–12157 (2008).
35. Schrödinger Release 2019-1. LigPrep. (2019).
36. Klamt, A. Conductor-like Screening Model for Real Solvents: A New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena. *J. Phys. Chem.* **99**, 2224–2235 (1995).
37. Jakobtorweihen, S., Zuniga, A. C., Ingram, T., Gerlach, T. & Keil, F. J. Predicting Solute Partitioning in Lipid Bilayers : Free Energies and Partition Coefficients from Molecular Dynamics Simulations and COSMOmic. *J. Chem. Phys.* **141**, 1–14 (2014).
38. Röcken, M., Schaller, M., Sattler, E. & Burgdorf, W. *Kapensní atlas dermatologie*. (Grada Publishing a.s, 2008).
39. Jarešová Růžičková, L. Dermatologická externa tekutá. *Dermatol. praxi* **3**, 93–97 (2009).
40. Jarešová Růžičková, L. Dermatologická externa polotuhé konzistence. *Dermatol. pro Praxi* **4**, 59–61 (2010).
41. Jarešová Růžičková, L. Dermatologická externa tuhá a polotuhá. *Dermatol. pro Praxi* **3**, 210–213 (2009).
42. Luellmann Heinz, Mohr Klaus, Ziegler Albrecht, B. D. *Barevný atlas farmakologie*. (Grada Publishing a.s, 2001).
43. Viktorinová, M. Přehled lokálních kortikosteroidů v dermatologii. *Dermatol. pro Praxi* **4**, 25–32 (2010).
44. Williams, A. C. & Barry, B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 128–137 (2012).
45. Nevalová, Z. Lokální léčba lupénky. *Prakt. Lékař.* **9**, 59–63 (2013).
46. Bienová, M. & Kučerová, R. Léčba akné. *Klin. Farmakol. a Farm.* **23**, 19–23 (2009).
47. Polášková, S. Emoliencia – základní bariérová externa. *Dermatol. pro Praxi* **7**, 127–128 (2013).
48. Obstová, I. & Iličová, S. Každodenní péče o suchou a citlivou pokožku. *Med. Pro Praxi* (2010).
49. Sieber, M. A. & Hegel, J. K. E. Azelaic acid: Properties and mode of action. *Skin*

- Pharmacol. Physiol.* **27**, 9–17 (2013).
50. Viktorinová, M. Přehled lokálních kortikosteroidů dermatologii 1. Možnosti léčby kožních chorob kortikosteroidními externy. *Klin Farmakol Farm* **20**, 202–210 (2006).
  51. Gutfreund, K., Bienias, W., Szewczyk, A. & Kaszuba, A. Topical calcineurin inhibitors in dermatology. Part I: Properties, method and effectiveness of drug use. *Postep. Dermatologii i Alergol.* **30**, 165–169 (2013).
  52. Carr, W. W. Topical calcineurin inhibitors for atopic dermatitis: Review and treatment recommendations. *Pediatr. Drugs* **15**, 303–310 (2013).
  53. Benáková, N. & Vašků, V. Retinoidy v dermatologii. *Ces. Dermatologie* **92**, 109–152 (2017).
  54. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* **36**, 901–906 (2008).
  55. Juračka, J., Šrejber, M., Melíková, M., Bazgier, V. & Berka, K. MolMeDB : Molecules on Membranes Database. *bioRxiv* (2018).
  56. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-4, Schrödinger, LLC. (2016).
  57. Kolossváry, I. & Keserü, G. M. Optimization : Application to c- jun. *J Comput Chem* **22**, 21–30 (2001).
  58. TURBOMOLE V6.3, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, (2011).
  59. Řezáč, J. Cuby: An integrative framework for computational chemistry. *J. Comput. Chem.* **37**, 1230–1237 (2016).
  60. Abraham, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
  61. Schrödinger, L. LigPrep 2.3 User Manual. 116 (2009). Available at: [https://isp.ncifcrf.gov/files/isp/uploads/2010/07/lp23\\_user\\_manual.pdf](https://isp.ncifcrf.gov/files/isp/uploads/2010/07/lp23_user_manual.pdf). (Accessed: 26th April 2019)
  62. Kaminski, G. A., Friesner, R. A., Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W. L. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B* **105**, 6474–6487 (2001).
  63. Clark Still, W., Tempczyk, A., Hawley, R. C. & Hendrickson, T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127–6129 (1990).
  64. Schrödinger, L. MacroModel 9.7 Reference Manual. 256 (2009). Available at: [https://isp.ncifcrf.gov/files/isp/uploads/2010/07/mm97\\_reference\\_manual.pdf](https://isp.ncifcrf.gov/files/isp/uploads/2010/07/mm97_reference_manual.pdf). (Accessed: 26th April 2019)
  65. Sorensen, D. C. *Implicitly Restarted Arnoldi/Lanczos Methods for Large Scale Eigenvalue Calculations*. (Langley Research Centre, 1996). doi:23681-0001
  66. RStudio team. RStudio: Intergrated Development Environment for R. (2016).
  67. Kuhn, M., Letunic, I., Jensen, L. J. & Bork, P. The SIDER database of drugs and side effects. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1075–D1079 (2016).
  68. Fonger, G. C., Hakkinen, P., Jordan, S. & Publicker, S. The National Library of Medicine’s (NLM) Hazardous Substances Data Bank (HSDB): Background, recent enhancements and future plans. *Toxicology* **325**, 209–216 (2014).
  69. SIDER 4.1 : Side Effect Resource. Available at: <http://sideeffects.embl.de/drugs/6918462/>. (Accessed: 20th April 2019)
  70. SIDER 4.1 : Side Effect Resource. SIDER 4.1 : Side Effect Resource. Available at: <http://sideeffects.embl.de/drugs/2786/>. (Accessed: 20th April 2019)
  71. TOXNET Toxicology Data Network. Available at: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6380>. (Accessed: 20th April 2019)
  72. SIDER 4.1 : Side Effect Resource. Available at: <http://sideeffects.embl.de/drugs/5372/>. (Accessed: 20th April 2019)
  73. Dickson, C. J., Hornak, V., Pearlstein, R. A. & Duca, J. S. Structure-kinetic relationships of passive membrane permeation from multiscale modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 442–452 (2017).

74. Berka, K. & Bazgier, V. *Racionální návrh léčiv pomocí in silico metod.* (Univerzita Palackého v Olomouci, 2015).
75. European Commission. Animals used for scientific purposes. (2018). Available at: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/3r/alternative\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/alternative_en.htm). (Accessed: 23rd March 2019)
76. Atkins Peter, D. P. J. *Fyzikální chemie.* (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013).
77. Dréno, B. *et al.* Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **32**, 5–14 (2018).
78. Klener, P. *et al.* *Vnitřní lékařství.* (Galén, 2011).

## Přílohy

**Tabulka 16:** Nejdůležitější vypočtené hodnoty všech léčiv v práci použitých na modelové membráně CER metodou COSMOmic 18.

Barevné značení druhů léčiv v tabulce: retinoidy – světle modrá, kortikosteroidy – bílá, protizánětlivá léčiva – fialová, nezařazené – šedá, keratolytika – žlutá, antiinfektiva – světle zelená, deriváty vitamínu D – oranžová, antibiotika – tmavě zelená, antiseptika – červená, inhibitory kalcineurinu - černá

Léčivo	MW [Da]	$\Delta G_{diff}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{pen}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{wat}$ [kcal/mol]	logK <sub>m</sub> CER	$\Delta G_{bind}$ [kcal/mol]
Adapalene	412,523	-10,709	3,556	14,265	9,521	-11,90
Alclometasone	408,918	5,88	7,757	1,877	0,242	-0,30
Amcinonide	502,574	-0,038	3,753	3,791	2,002	-2,50
Anthralin	226,229	-4,296	0,157	4,453	3,051	-3,81
AzelaicAcid	188,222	4,972	6,708	1,736	0,596	-0,74
Benzoylperoxide	242,228	-4,919	0,727	5,646	3,622	-4,53
Betamethasone	392,463	4,998	7,489	2,491	0,947	-1,18
Bithionol	356,054	-8,852	0,624	9,476	6,373	-7,96
Calcipotriol	412,607	-2,226	6,904	9,13	5,613	-7,02
Calcitriol	416,639	-4,129	6,261	10,39	6,604	-8,25
Clindamycin	424,986	-3,721	2,906	6,627	3,964	-4,95
Clobetasone	408,893	3,109	6,53	3,421	1,588	-1,98
Clocortolone	410,909	3,688	6,192	2,504	1,007	-1,26
Desonide	416,51	6,418	8,725	2,307	0,837	-1,05
Desoximetasone	376,464	3,608	6,431	2,823	1,238	-1,55
Diflorasone	410,454	5,266	7,067	1,801	0,208	-0,26
Difluocortolone	394,454	3,864	6,406	2,542	0,931	-1,16
Erythromycin	733,931	-8,146	1,5	9,646	6,357	-7,94
Etretinate	354,485	-14,058	0,264	14,322	9,931	-12,41
Flumethasone	410,454	5,127	7,133	2,006	0,301	-0,38
Fluocinolone Acetonide	452,491	7,118	9,158	2,04	0,554	-0,69
Fluprednidene	390,447	6,24	7,932	1,692	0,218	-0,27
Fluticasone Propionate	500,574	0,492	3,98	3,488	1,812	-2,26
FusidicAcid	516,712	-2,68	6,408	9,088	5,601	-7,00
Gentamicin	477,598	9,191	12,437	3,246	1,502	-1,88
Halcinonide	454,962	-0,938	3,236	4,174	2,28	-2,85
Hydrocortisone	362,462	4,002	6,301	2,299	0,783	-0,98
Chlorhexidine	505,449	-0,205	10,702	10,907	7,023	-8,78

Léčivo	MW [Da]	$\Delta G_{diff}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{pen}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{wat}$ [kcal/mol]	logK <sub>m</sub> CER	$\Delta G_{bind}$ [kcal/mol]
Isotretinoin	300,437	-8,181	2,792	10,973	7,272	-9,09
LacticAcid	90,078	7,027	7,395	0,368	-0,7	0,87
Meclocycline	476,866	2,181	4,945	2,764	1,223	-1,53
Methyl- prednisolone	374,473	4,576	7,252	2,676	1,069	-1,34
Mometasone	427,364	3,438	6,931	3,493	1,606	-2,01
Mupirocin	500,625	1,664	6,67	5,006	2,771	-3,46
Natamycin	665,729	8,412	12,751	4,339	2,294	-2,87
Pimecrolimus	810,458	-13,656	2,129	15,785	10,4	-13,00
Prednicarbate	488,573	-0,587	3,712	4,299	2,426	-3,03
Prednisolone	360,446	5,327	7,472	2,145	0,605	-0,76
Propyleneglycol	76,095	6,877	6,96	0,083	-1,087	1,36
Resorcinol	110,111	6,344	7,456	1,112	0,13	-0,16
Retapamulin	517,767	-5,625	1,347	6,972	4,485	-5,61
Salicylicacid	138,121	1,707	3,677	1,97	0,904	-1,13
Sulfacetamide	214,243	9,607	10,977	1,37	0,194	-0,24
Tacrolimus	804,023	0,992	13,077	12,085	7,702	-9,63
Tazarotene	351,464	-7,983	1,08	9,063	6,055	-7,57
Tetracycline	444,437	3,386	6,616	3,23	1,469	-1,84
Tretinoin	300,437	-8,546	3,391	11,937	7,828	-9,78
Triamcinolone	394,436	8,478	10,025	1,547	0,053	-0,07
Triclosan	289,543	-7,486	0,491	7,977	5,369	-6,71
Ulobetasol	428,899	4,845	8,294	3,449	1,584	-1,98
Urea	60,055	12,092	12,326	0,234	-0,938	1,17

**Tabulka 17:** Vypočtené hodnoty  $\Delta G_{diff}$  pro jednotlivé membrány metodou COSMOmic 15

Barevné značí druhů léčiv v tabulce: retinoidy – světle modrá, kortikosteroidy – bílá, protizánětlivá léčiva – fialová, nezařazené – šedá, keratolytika – žlutá, antiinfektiva – světle zelená, deriváty vitamínu D – oranžová, antibiotika – tmavě zelená, antiseptika – červená, inhibitory kalcineurinu - černá

Ligand	CER	SC	DOPC	DMPC
	$\Delta G_{diff}$ [kcal/mol]			
Adapalene	-8,33	-8,34	-11,87	-11,86
Alclometasone	2,93	3,02	-0,64	-0,1
Amcinonide	-2,38	-2,36	-6,67	-6,22
Anthralin	-5,59	-5,59	-5,95	-5,78
Azelaic Acid	3,63	3,63	0,86	1,42
Benzoylperoxide	-5,64	-5,57	-6,63	-6,51
Betamethasone	3,05	3,18	-0,57	-0,15
Bithionol	-8,28	-8,26	-8,72	-8,61
Calcipotriol	0,13	0,13	-4,93	-4,73
Calcitriol	-1,45	-1,42	-6,23	-6
Clindamycin	-4,91	-4,94	-7,36	-7,09
Clobetasone	0,91	0,94	-2,86	-2,49
Clocortolone	1,32	1,45	-2,41	-2,02
Desonide	4,83	4,9	-0,04	0,44
Desoximetasone	1,52	1,67	-2,29	-1,92
Diflorasone	2,54	2,66	-0,98	-0,47
Difluocortolone	1,44	1,57	-2,35	-2,1
Erythromycin	-3,23	-3,23	-7,94	-7,16
Etretinate	-11,75	-11,72	-13,63	-13,79
Flumethasone	2,37	2,48	-1,1	-0,59
Fluocinolone Acetonide	4,95	5,04	0,22	0,76
Fluprednidene	3,52	3,64	0,09	0,39
Fluticasone Propionate	-1,81	-1,81	-6,1	-5,53
Fusidic Acid	-2,23	-2,24	-7,13	-6,71
Gentamicin	8,65	8,67	3,83	4,37
Halcinonide	-3,09	-3,08	-6,75	-6,48
Hydrocortisone	2,47	2,63	-0,94	-0,59
Chlorhexidine	1,51	1,55	-3,89	-3,6
Isotretinoin	-6,68	-6,68	-9,11	-8,97
Lactic Acid	5,06	5,09	3,84	4,27
Meclocycline	0,49	0,34	-0,91	-0,59
Methyl-prednisolone	2,81	2,95	-0,98	-0,56

Ligand	CER	SC	DOPC	DMPC
Mometasone	0,53	0,55	-3,01	-2,8
Mupirocin	0,73	0,7	-2,44	-1,45
Natamycin	7,1	7,09	-0,21	0,6
Pimecrolimus	-7,7	-7,74	-10,25	-9,67
Prednicarbate	-2,24	-2,2	-6,89	-6,13
Prednisolone	3,31	3,47	-0,33	0,07
Propyleneglycol	5,06	5,08	4,44	4,66
Resorcinol	4,61	4,63	3,29	3,82
Retapamulin	-3,9	-3,91	-5,01	-4,91
Salicylic acid	0,45	0,49	-0,67	-0,28
Sulfacetamide	6,92	7,02	5	5,42
Tacrolimus	6,02	6,07	-5,76	-5,12
Tazarotene	-7,74	-7,7	-9,44	-9,27
Tetracycline	1,55	1,33	-0,39	0,05
Tretinoin	-6,87	-6,9	-10,18	-10,22
Triamcinolone	6,06	6,16	3,06	3,67
Triclosan	-7,31	-7,41	-7,58	-7,51
Ulobetasol	2,63	2,65	-1,03	-0,8
Urea	9,98	10,09	8,87	9