

Disertační práce

**Struktura, dynamika a interakce substituovaných
molekul hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech**

**Structure, dynamics and interactions of substituted hyaluronan
molecules in mixed solvents**

Autor: Ing. Alena Kolaříková
Studijní program: Technologie makromolekulárních látek
Školitel: doc. RNDr. Marek Ingr, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Eva Kutálková, Ph.D.

Zlín, 2025

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu doc. RNDr. Marku Ingrovi, Ph.D. za podporu v průběhu celého studia, trpělivé vedení, vstřícný přístup a cenné rady. Velké díky patří také mé konzultantce (a vedoucí mé bakalářské a diplomové práce) RNDr. Evě Kutálkové, Ph.D. za nadšenou spolupráci, zodpovězení veškerých otázek nejen z oblasti fyziky, neustávající motivaci k další práci a celkově za to, jakým je mi úžasným vzorem.

Dále děkuji i všem „spolužákům“ na doktorátu a všem kolegům z Ústavu fyziky a materiálového inženýrství, kteří mě mezi sebe přijali s otevřenou náručí a díky nimž jsem se zde během svého studia cítila jako doma.

V neposlední řadě bych pak chtěla poděkovat také své sestře a celé své rodině a přátelům za neustávající podporu nejen v mém studiu.

Výpočetní zdroje byly poskytnuty v rámci projektu „e-Infrastruktura CZ“ (e-INFRA CZ, ID: LM2018140 a ID: 90140, případně ID: 90254), který je podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. Tato práce byla rovněž podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR prostřednictvím e-INFRA CZ (ID: 90140, 90254).

Abstrakt

Tato práce se zabývá molekulárně dynamickými simulacemi hyaluronanu sodného a jeho modifikovaných forem, kde byly na páteř řetězce navázány alifatické substituenty odvozené od kyseliny stearové. Jejím cílem bylo analyzovat chování substituovaného hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech voda:1,4-dioxan a voda:terc-butanol při různých koncentracích NaCl. Takovéto systémy mají klíčové uplatnění v biomedicíně, tkáňovém inženýrství nebo ve farmacii, zejména jako nosiče léčiv. V rámci experimentální části proto byly provedeny simulace substituovaných i nesubstituovaných řetězců za různých podmínek (teplota, koncentrace soli, poměr vodné a organické složky v rozpouštědle). Mezi hlavní sledované charakteristiky patřila ohebnost řetězců, distribuce rozpouštědla v bezprostředním okolí, jejich vzdálenost a míra interakce (v případě simulací více řetězců). Studován byl i vliv stupně substituce a samotné přítomnosti alifatických substituentů, a to jak na dynamiku samostatných řetězců, tak na jejich interakci. V zájmu lepšího porozumění chování substituentů byly dále simulovány i samostatné alifatické řetězce. Získané výsledky ukázaly silný vliv použitého rozpouštědla a přítomnosti soli na všechny výše jmenované charakteristiky.

Klíčová slova: *hyaluronan, molekulová dynamika, hydrofilní biomolekuly, nosiče léčiv, směsná rozpouštědla*

Abstract

The work addresses molecular dynamics simulations of sodium hyaluronate and its modified forms, where aliphatic substituents derived from stearic acid were attached to the polymer backbone. The aim was to analyze the behavior of substituted hyaluronan in mixed solvents of water:1,4-dioxane and water:tert-butanol at varying NaCl concentrations. Such systems have key applications in biomedicine, tissue engineering, and pharmaceuticals, particularly as drug delivery carriers. In the experimental part, simulations of both substituted and unsubstituted chains were performed under different conditions (temperature, NaCl concentration, ratio of aqueous and organic components in the solvent). The main monitored characteristics included chain flexibility, solvent distribution in the immediate vicinity of chains, and also their distance and degree of interaction (in the case of multiple-chain simulations). The influence of the degree of substitution and the presence of aliphatic substituents was studied both on the dynamics of individual chains and on their interactions. To gain a better understanding of the behavior of the substituents, separate aliphatic chains were also simulated. The obtained results demonstrated a strong influence of the solvent used and the presence of salt on all the above-mentioned characteristics.

Key words: *hyaluronan, molecular dynamics, hydrophilic biomolecule, drug carriers, mixed solvents*

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Současný stav poznání	8
3. Cíle disertační práce	9
4. Teoretický rámec.....	10
4.1 Kyselina hyaluronová	10
4.1.1 Výskyt	10
4.1.2 Role kyseliny hyaluronové v tělech savců	11
4.1.3 Syntéza hyaluronanu v živých organismech	12
4.1.4 Průmyslová syntéza hyaluronanu	13
4.1.5 Chemická struktura kyseliny hyaluronové	13
4.1.6 Vlastnosti.....	17
4.1.7 Aplikace kyseliny hyaluronové v praxi	20
4.2 Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci.....	23
4.3 Směsná rozpouštědla.....	24
4.3.1 Směs vody a 1,4-dioxanu	24
4.3.2 Směs vody a terc-butanolu	25
4.4 Molekulová dynamika	26
4.4.1 Princip MD simulací.....	26
4.4.2 Software NAMD 2.0	28
4.4.3 Software VMD	28
4.4.4 Model vody TIP3P	29
5. Metody	30
5.1 Parametry simulací	30
5.2 Charakterizace výsledků	31
6. Výsledky.....	34
6.1 Systémy s nesubstituovanými řetězci	34
6.1.1 Dynamika a interakce hyaluronanu ve vodném prostředí	34
6.1.2 Prostředí směsných rozpouštědel.....	37
6.1.3 Dynamika hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech.....	38

6.1.4	Interakce hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech.....	41
6.2	Simulace samostatných alifatických řetězců.....	45
6.2.1	Složení směsi v blízkosti alifatických řetězců	46
6.2.2	Ohebnost alifatických řetězců a jejich vzájemná interakce	48
6.3	Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci.....	51
6.3.1	Distribuce rozpouštědla v okolí substituovaných řetězců.....	52
6.3.2	Distribuce iontů v okolí substituovaných řetězců.....	54
6.3.3	Orientace substituentů v prostoru	56
6.3.4	Vliv substituentů na ohebnost řetězců	59
6.4	Simulace dvou substituovaných řetězců HA.....	63
6.4.1	Afinita substituovaných hyaluronanových řetězců.....	64
6.4.2	Typy interakcí mezi substituovanými řetězci	66
6.4.3	Interakce alifatických substituentů	70
6.4.4	Dynamika substituovaných řetězců hyaluronanu	72
7.	Přínos pro vědu a praxi.....	74
8.	Závěr.....	75
	Reference.....	77
	Seznam obrázků.....	93
	Seznam tabulek.....	97
	Seznam použitých zkratk	98
	Publikační aktivity autorky.....	100
	Odborný životopis autorky	101
	Přílohy	103

1. Úvod

Kyselina hyaluronová (HA z angl. hyaluronic acid) neboli hyaluronan je biomolekula s velkým významem nejen v oblasti moderní biomedicíny a materiálového inženýrství. Tento přírodní polysacharid s chemickým vzorcem $([4\text{-}\beta\text{-d-GlcpA-(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-d-GlcpNAc-(1 \rightarrow)}_n])$ se přirozeně vyskytuje v tělech většiny savců včetně člověka, a to v podobě disociované soli (nejčastěji sodné). Díky svým unikátním vlastnostem a širokému spektru aplikací nabývá na stále větší popularitě nejen v technologických aplikacích, ale i u laické veřejnosti.

V praxi se HA již dlouho využívá nejen v kosmetickém průmyslu, ale také ve farmacii a lékařství, zejména v oblasti oftalmologie, dermatologie a ortopedie. Využívá se také jako nosič léčiv, ale pro tyto účely jsou nutné její modifikace. [1,2]

Nadějnou modifikační metodou se zdá být připojení alifatických řetězců, čímž se kyselina hyaluronová stává hydrofobizovanou a tedy i amfifilní. Takto upravené řetězce jsou schopné samovolného formování do tvaru nanočástic micelového typu, kdy hydrofobní substituenty mají tendenci se shlukovat uvnitř. Při využití modifikované HA ve farmacii jako nosiče léčiv je pak do takto uspořádané nanočástice možné začlenit aktivní látku a bezpečně ji dopravit do místa v těle, kde je potřeba. [3,4]

Jednou z možností přípravy takto modifikované HA je esterifikace jejích karboxylových skupin některou z alkylátových mastných kyselin (v rámci předchozích výzkumů byly testovány mimo jiné kyseliny hexanová, oktanová, dodekanová, stearová, linolová nebo arachidová) v prostředí směsných rozpouštědel vody a organické látky. Maximálního hydrofobního efektu je dosaženo, pokud jsou naroubované substituenty co nejdélší (a to i přesto, že délka substituentů snižuje možný stupeň substituce). HA řetězce s dlouhými substituenty potom lépe interagují se zapouzdřenými molekulami, například s léčivy nebo jinými bioaktivními látkami, a obecně přinášejí nové funkční vlastnosti, které stále nejsou zcela popsány. [3,5]

Velký vliv na efektivitu esterifikace, rychlost reakce a rovnoměrnost distribuce substituentů mají nejen reakční podmínky (teplota, tlak...), ale také druh použitého rozpouštědla a případně i přítomnost anorganické soli [6]. To vše se promítá do potenciálních aplikací ve farmacii i jiných průmyslových odvětvích. Cílem této práce je proto co nejpřesnější popis výše zmíněného vlivu složení směsi rozpouštědel na dynamiku substituovaných HA řetězců s ohledem na popis jejich vzájemné interakce.

Pro co nejlepší porozumění dynamickému chování molekul a nuancím mezimolekulárních interakcí byl výzkum prováděn pomocí molekulově dynamických počítačových simulací. Tento efektivní nástroj pro popis struktury a dynamiky biomolekul je vyhledáván zejména pro svou dobrou shodu

s experimentem, atomární rozlišení a nízké náklady ve srovnání s experimentálními technikami.

2. Současný stav poznání

Kyselina hyaluronová je předmětem zájmu vědců už od svého objevení v roce 1934 [7]. Už během dvaceti let po první zmínce o této biomolekule byla popsána její role v synoviální tekutině a v lidském těle obecně [8,9], její metabolismus a to, jakou roli v něm hrají bakterie [10], a bylo nalezeno hned několik způsobů její extrakce z pupeční šňůry [11].

S každou další zjištěnou informací o kyselině hyaluronová zájem o ni rostl a do konce dvacátého století bylo poměrně přesně zmapováno, kde všude v živých organismech je možné HA najít [12–14], jaká je její funkce v těle [15–17] a byly popsány její neobvyklé reologické vlastnosti [18–22] i konformace připomínající šroubovici.

Výzkum struktury této biomolekuly byl prováděn převážně s využitím NMR, rentgenového rozptylu nebo spektroskopie [20,23–28]. S pokrokem počítačové techniky se však HA začala zkoumat i s pomocí molekulově dynamických simulací [29,30] nebo kombinací experimentálních a výpočetních metod [27,31]. To umožnilo poměrně přesný popis struktury i dynamiky řetězců, přestože některé otázky zůstaly otevřeny – třeba zda mezi řetězci HA v roztoku dochází k interakcím [32,33].

Za účelem zefektivnění aplikací se rozvinul i výzkum různě modifikovaného hyaluronanu, ať už pomocí thiolových skupin [34,35], liposomů [36–38], peptidů (kdy peptidové řetězce je buď možné napojit přes karboxylovou skupinu [39], nebo se pomocí oxidace naruší jeden ze sacharidových cyklů HA řetězce a peptidy se navážou na vzniklé aldehydicke skupiny [40,41]), ligninů [42], nebo karboxylových kyselin. Esterifikací HA karboxylovými kyselinami je totiž dosaženo hydrofobních vlastností nově vzniklé molekuly a ta se pak může využít například jako nosič léčiv [3,43–45] nebo v oftalmologii [5].

Substituce karboxylovými kyselinami se nejčastěji provádějí v etherických rozpouštědlech. Důvodem je jejich snadná mísitelnost s vodou a efektivita při provádění reakce. Změnou reakčních podmínek či rozpouštědla pak lze snadno ovlivnit stupeň substituce, protože složení rozpouštědla má na průběh reakce a rovnoměrnost substituce značný vliv. [5,6,43]

Přestože HA byla pomocí molekulové dynamiky zkoumána několikrát a organická směsná rozpouštědla také [46–48], zatím nebyly provedeny téměř žádné simulace hyaluronanových řetězců v těchto rozpouštědlech.

3. Cíle disertační práce

- Charakterizace struktury hyaluronanových řetězců v prostředí čisté vody i směsných rozpouštědel typu voda:organická složka (konkrétně voda:1,4-dioxan a voda:terc-butanol) ve třech různých koncentracích NaCl (0 M, 0.1 M a 0.2 M)¹.
- Příprava modelů oligosacharidů hyaluronátu sodného, substituovaných v různých polohách alifatickými řetězci a solvatovaných směsnými rozpouštědly typu voda:organická látka při různých koncentracích NaCl.
- Provedení simulačních výpočtů metodou molekulové dynamiky, vyhodnocení výsledků a posouzení vlivu rozpouštědel a substituentů na strukturu a dynamiku řetězců hyaluronátu sodného.
- Příprava a provedení simulací pro dva substituované řetězce, vyhodnocení míry jejich případných interakcí a posouzení vlivu těchto interakcí na dynamiku řetězců. Dále zhodnocení vlivu substituentů na množství intermolekulárních interakcí při srovnání s nesubstituovanými řetězci.

¹Pro zachování konzistence s již publikovanými výsledky a grafy byly v této práci použity desetinné tečky.

4. Teoretický rámec

4.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová bývá nazývána také hyaluronan, přestože hyaluronan je, technicky vzato, její polyionickou formou (která se ovšem v přírodě vyskytuje častěji, než čistá kyselina hyaluronová). Je to biomolekula přirozeně se vyskytující v lidském těle, kde hraje klíčovou roli ve fyziologické funkci kůže, kloubů a očí. Je hlavní složkou extracelulární matrix (ECM) – tj. sítě proteinů a dalších molekul, které poskytují strukturální podporu buňkám a tkáním po celém těle.

Poprvé byla popsána a pojmenována biochemikem Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem, kteří v roce 1934 vydali článek v Journal of Biological Chemistry [7]. Už o téměř dvacet let dříve však jiní vědci izolovali směs hyaluronanu a dalších glykosaminoglykanů [49]. Brzy po první zmínce o HA byly objeveny i její unikátní vlastnosti a výzkumem této biomolekuly se začalo zabývat mnoho vědců. Probíhala její extrakce z mnoha různých tkání zvířat, ale i první produkce pomocí bakterií – z hlediska aktuální výroby HA velmi důležitý objev [50].

Už během druhé světové války se HA začala využívat v medicíně, původně do obvazů na ošetření omrzlin, byť v té době se ještě nevědělo, že je to HA, co dodává výtažku z pupeční šňůry regenerační vlastnosti. Později byla objevena celá řada dalších možných aplikací od pooperačního hojení přes léčbu artritidy až po první použití ve viskochirurgii oka. [51]

Dnes je HA předmětem zkoumání mnoha různých vědeckých disciplín, jako je zejména makromolekulární chemie, radiochemie, biochemie, glykobiologie, molekulární biologie, nebo přímo medicína.

4.1.1 Výskyt

Kyselina hyaluronová je přítomna v mnoha tkáních a orgánech u lidí i zvířat. V literatuře je nejčastěji udávaným místem výskytu HA mezibuněčná hmota (tj. ECM), dále pokožka a jiné pojivové tkáně (např. žilní a tepenná stěna krevních i lymfatických cév), vyskytuje se však také na jiných místech, například ve výstelce břišní dutiny jako součást peritoneálních mezotelových buněk a peritoneální tekutiny. [52,53]

HA se v hojném množství vyskytuje také ve zrakovém systému. Najdeme ji zejména v rohovkovém epitelu, kde stimuluje proliferaci buněk a jejich migraci [12,13,54] a to jak u lidí, tak i u zvířat (v některých částech oka se HA dokonce vyskytuje pouze u zvířat, např. v očním bělmu nebo některých pojivových tkáních myši [55]). Dále se vyskytuje také v trabekulární síti (kde reguluje fyziologický

nitrooční tlak), v zorničkách (zejména v případě jejich poškození), v ECM čoček, ale také ve sklivci, v sítnici, optických nervech a dalších částech oka. HA je zde dokonce možné najít už v embryonálním stádiu vývoje – u embryí makaků byla pozorována v nejen bazálních membránách a čočce, ale i v rohovce a dalších očních tkáních [56].

Dalším místem, kde je v těle možné najít HA je dýchací soustava, převážně v surfaktantu plicních sklípků [57], i když obecně je možné říct, že je HA v plicích součástí všech důležitých tkání. Najdeme ji tak v alveolách, průduškách, pohrudnici, nebo také v cévách a v mnoha dalších orgánech opět nejen u lidí, ale i u zvířat [58].

Mimo výše uvedené se HA vyskytuje ještě na mnoha dalších místech těla, ať už se jedná o synoviální tekutinu kloubů, pupeční šňůru, orgány reprodukčního systému, nervovou tkáň nebo samotný mozek. [59–61]

4.1.2 Role kyseliny hyaluronové v tělech savců

V kloubech se HA vyskytuje jako součást synoviální tekutiny, kde významně přispívá k jejím viskoelastickým vlastnostem. Nejen v kloubech, ale i na mnoha jiných místech těla působí jako přirozený lubrikant (tvoří výplň mezi pohyblivými částmi tkání), který snižuje tření mezi namáhanými kostmi a chrupavkami a zmírňuje tak jejich opotřebení [14]. Jakožto ochranná vrstva mezi klouby také absorbuje nárazy a během pohybu působí jako tlumič [62]. Funguje i jako protizánětlivá látka, protože brání tkáni před přichycením nebezpečných mediátorů [63]. Neméně důležitou rolí je transport, kdy synoviální tekutina představuje jakýsi biochemický rezervoár pro průchod živin ke chrupavkám. [15,64,65]

V očích (téměř ve všech částech oka) přispívá HA ke strukturní integritě tkání, podporuje migraci buněk a buněčnou signalizaci. Na základě studie, provedené na oku králíka [66], bylo zjištěno, že sodná sůl kyseliny hyaluronové (o koncentraci 1 a 2 %) má velký vliv na zacelování ran v epitelální vrstvě rohovky, zejména v pozdějších fázích hojení. Další studie později tento fakt potvrdily, když bylo pozorováno, že HA významným způsobem stimuluje migraci epitelových buněk rohovky. Tím bylo také dokázáno, že jeho vliv na hojení ran je přímým důsledkem farmakologických vlastností hyaluronátu sodného bez ohledu na vnější faktory (s výjimkou koncentrace sodné soli). [13,67] V dnešní době se při oftalmologických operacích přidává HA z vnějšího zdroje, nicméně i poraněné oko je schopné si HA syntetizovat, takže je možné, že v budoucnosti budou vyvinuty metody, které jen podpoří tento přirozený proces a nebude nutné dodávat HA zvenčí [68].

V plicních sklípcích je primární rolí HA tvorba hydrofilního gelu pomocí interakce se specifickými proteiny ve vodné fázi a také částečnou self-agregací. Vzniklý gel pak tvoří strukturu vodné subfáze a zahlašuje nerovnosti vrstvy buněk. Také

interaguje s povrchovými fosfolipidy, čímž zvyšuje stabilitu povrchové vrstvy a aktivně brání zhroucení stěny sklípku. HA zde navíc mimo jiné plní také roli imunomodulátoru, kdy v rámci povrchové vrstvy tvoří součást hlavní obranné linie proti bakteriím ze vzduchu. [57]

Hladina HA v těle narůstá v období těhotenství [16], při hojení ran [52], nebo při boji s určitými typy onemocnění, jako jsou některé záněty, nebo také rakovina, během níž se HA nachází přímo v nádorech či jejich okolí. Samotná role HA ve vývoji nádorů je velmi komplexní – může zde napomáhat migraci rakovinných buněk, nebo také podporovat interakce buněk s mezibuněčnou hmotou v jejich okolí, čímž může mít zvyšovat agresivitu nádoru a pomáhat jeho růstu a šíření. Detekcí zvýšeného množství HA v daném místě by ale mohlo být možné odhalit přítomnost rakovinných buněk. Dalším možným řešením by mohlo být zacílit a následně rozštěpit přímo hyaluronan (pomocí specifických enzymů – hyaluronidáz), tím u nádoru zpomalit růst a zároveň snížit agresivitu. [69,70]

V případě poranění HA (ať už dodávaná zvenčí, nebo ta, kterou poraněné tkáni poskytne tělo) pomáhá při hojení. Také přímo ovlivňuje stárnutí nejen kůže, ale i dalších tkání. S věkem totiž množství HA ve tkáních klesá nebo klesá jeho kvalita (řetězce degradují na menší fragmenty, čímž se mění i jejich vlastnosti). Proto se pak v důsledku nedostatečné vlhkosti a pružnosti kůže tvoří vrásky [53].

4.1.3 Syntéza hyaluronanu v živých organismech

Syntéza HA probíhá prostřednictvím enzymově katalyzovaného procesu, nazývaného glykosylace. Proces zahrnuje postupné navazování glukoronové kyseliny a N-acetylglukosaminu k rostoucí molekule. Celá reakce je katalyzována specifickými enzymy – tzv. hyaluronan syntázami, vyskytujícími se v buněčné membráně, a probíhá na její vnitřní straně. Skrz buněčnou membránu je pak vzniklá HA vylučována do mezibuněčného prostoru. Tento proces byl detekován na mnoha různých místech těla – téměř ve všech místech, kde se později HA vyskytuje, může probíhat i její syntéza. [68]

Některé druhy škodlivých bakterií (převážně z rodu *Streptococcus*, ale i *Staphylococcus*, *Pasteurella* a dalších) dokáží syntetizovat HA stejně jako eukaryotické organismy. Protože hyaluronan se v těle lidí a zvířat přirozeně vyskytuje a není antigenní (bez ohledu na to, čím je vyprodukován), jeho dodání nevzbuzuje imunitní reakci. Bakterie proto mohou HA využívat jako mimikry. Tuto funkci plní HA i u kvasinek druhu *Cryptococcus neoformans*. [18,71–73]

4.1.4 Průmyslová syntéza hyaluronanu

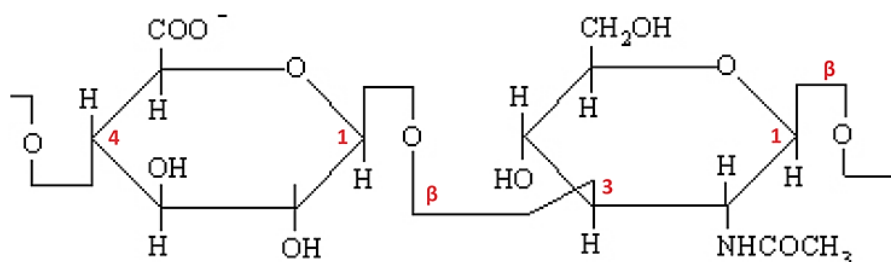
Historicky se HA extrahovala z pupeční šňůry a později pak z kohoutích hřebínků. Z důvodů snížení ceny, menšího environmentálního dopadu a také pro omezení farmaceutického využívání látek získaných přímo ze zvířat, se většinová produkce HA zaměřila na mikrobiální fermentaci s použitím bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus* [74–77], konkrétně jeho kmenů A a C. Kvůli obavám z patogenní povahy streptokoků se dnes zkoumají alternativní metody [78,79].

Nejnovější z nich je rekombinantní produkce pomocí jiných bakterií, mezi nimi i *Escherichia coli* [80]. Problémem těchto metod je cena potřebných materiálů a dále také fakt, že produkt musí být ještě dodatečně čištěn – důležité zejména pro medicínské a kosmetické aplikace, kdy nedostatečné vyčištění může vést k alergické reakci. To je ovšem obecný problém mikrobiálně fermentačních metod (i v případě použití streptokoků). Navíc je vzniklá HA směsí různých molekulárních hmotností – na metodě, kterou by bylo možno vyprodukovat hyaluronan o co nejnižší možné disperzitě, se stále ještě pracuje. [81–83]

4.1.5 Chemická struktura kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je lineární polymer, který patří do skupiny heteropolysacharidů zvaných glykosaminoglykany. Tyto biomolekuly jsou charakteristické svým složením z disacharidových jednotek aminosacharidu (N-acetylglukosamin nebo N-acetylgalakosamin) a uronové kyseliny (to jsou např. kyseliny glukuronová, galakturonová, nebo iduronová). Mezi glykosaminoglykany patří heparin/heparan sulfát, chondroitin sulfát/dermatan sulfát, keratan sulfát a právě kyselina hyaluronová.

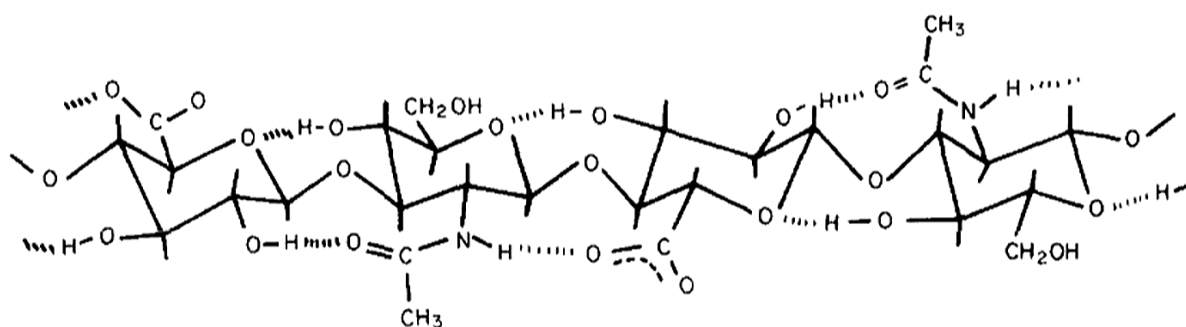
HA se od ostatních glykosaminoglykanů liší tím, že není sulfatovaná a není syntetizovaná enzymy Golgiho aparátu. Skládá se z alternujících monosacharidových jednotek kyseliny β -D-glukuronové (GCU, resp. G) a β -D-N-acetylglukosaminu (NAG, resp. N), spojených glykosidickými vazbami β -1,3 a β -1,4 (viz Obr. 1). [17,84]



Obr. 1 – Struktura hyaluronanu: GCU (vlevo) a NAG (vpravo) [85]

Za fyziologických podmínek bývá HA disociovaná – každá karboxylová skupina má proto záporný náboj a celá HA je tak polyaniontem (proto „hyaluronan“). V roztocích obsahujících kationty (nejčastěji Na^+ , K^+ , Ca^{2+} nebo Mg^{2+}) tvoří vysoce hydrofilní soli. [86]

Vzhledem k chemické struktuře monosacharidů, kterými je tvořen, je vzniklý polysacharid velmi energeticky stabilní, jelikož všechny velké funkční skupiny jsou ve stericky preferované ekvatoriální pozici [21]. Řetězce jsou navíc zpevněny intramolekulárními vodíkovými vazbami mezi jednotlivými sacharidovými jednotkami (Obr. 2). I proto je rotace podél vazeb propojujících monosacharidy minimální. Pouze v přítomnosti iontů může docházet k významnějšímu přetáčení některých dihedralních úhlů, protože vodíkové vazby mezi cykly jsou těmito ionty rozrušeny (více v podkapitole 4.1.6 o chování HA v roztocích soli).



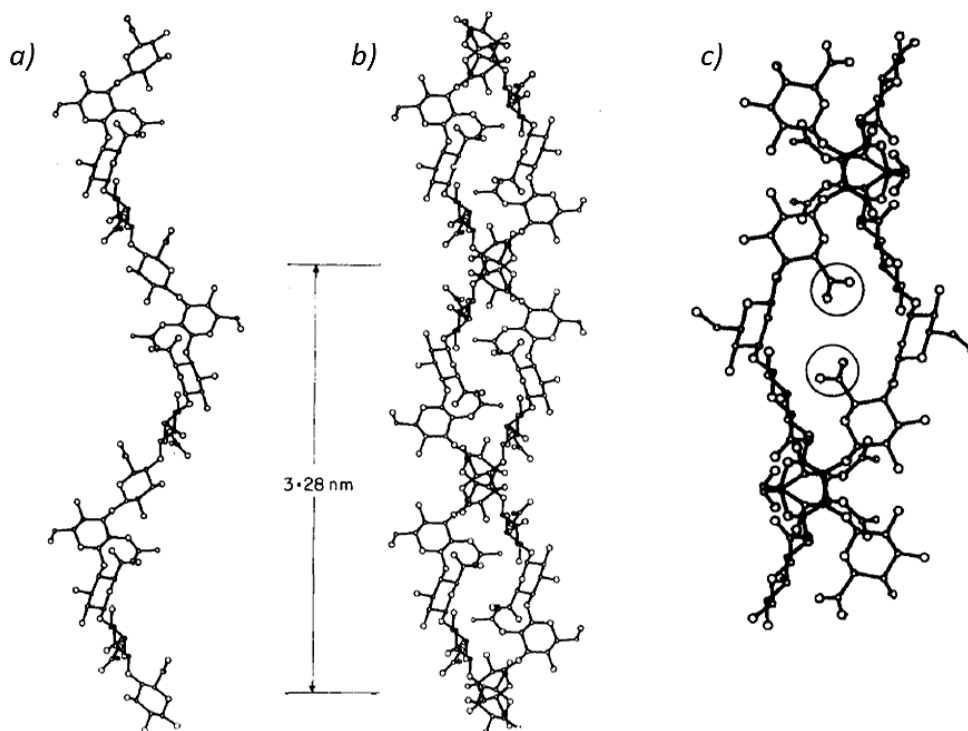
Obr. 2 – Předpokládaná přirozená struktura řetězce HA s intramolekulárními vodíkovými vazbami [87]

HA se může vyskytovat ve formě viskoelastického roztoku, jako součást buněčných struktur, ale také ve formě nanočástic [88]. Může být lineární, nebo síťovaná (tedy ve formě hydrogelu). Hydrogely jsou v technické praxi získávány pomocí enzymatických procesů, například síťováním tyraminem [89], nebo začleněním thiolových skupin do molekuly, která se pak síťuje právě pomocí nově začleněných thiolových skupin [90]. Mimo tyto dva způsoby existuje ještě mnoho dalších metod a možností, jak hyaluronan zesíťovat, třeba s pomocí Schiffových bází [91].

Případné intermolekulární interakce mezi jednotlivými HA řetězci jsou zprostředkovány vodíkovými vazbami, iontovými mosty (kdy jeden ion interaguje se dvěma HA řetězci současně) anebo hydrofobní interakcí. V čistě vodném roztoku je takovýchto interakcí jen velmi málo, ale za přítomnosti soli jejich počet narůstá [92]. I přesto není vliv těchto vazeb v čisté vodě příliš velký (podrobnější rozbor poskytuje výsledková sekce).

Terciární struktura HA výrazně ovlivňuje její biologické vlastnosti a sama je ovlivňována mnoha faktory, mimo jiné teplotou, pH, nebo přítomností enzymů. Jakou přesně konformaci HA zaujímá je proto možné popsat pouze ve vztahu ke specifickým podmínkám. Zatímco za těch obvyklých má HA tvar velmi nabobtnalého náhodného klubka, v některých roztocích a za přítomnosti konkrétních kationtů zaujímají jednotlivé řetězce HA konformaci šroubovice a v některých případech spolu dokonce více řetězců tvoří složitější duplexní struktury. Přesný popis těchto šroubovic a dvoušroubovic se podle jednotlivých zdrojů liší:

Skupina J. Sheehana (a pět let před ním také I. Dea) popisuje ve svém článku antiparalelní dvoušroubovici, složenou ze dvou levotočivých struktur o čtyřech disacharidových jednotkách na jeden závit, držící pohromadě zejména díky opačné polaritě bočních skupin (Obr. 3). Navrhovaná šroubovice má při nízkém pH (tj. méně než 4) axiální posun 0.82 nm na jednu disacharidovou jednotku a byla zkoumána pomocí rentgenové difrakce HA, krystalizované za přítomnosti iontů (konkrétně K^+ , NH_4^+ , Rb^+ a Cs^+). Pozdější výzkum stejné skupiny tuto konformaci potvrdil a také byly popsány změny, způsobené úpravou pH a přítomností jiných – sodných a vápenatých – iontů. [23,93,94] Experiment J. Sheehana pak úspěšně zopakoval také S. Arnott se svou výzkumnou skupinou [95].



Obr. 3 – Terciární struktura HA podle článku J. Sheehana [93] (a – jeden řetězec, b – dvoušroubovice, c – detail orientace bočních skupin)

Ve článku J. Scotta a spol. [96] byly pomocí elektronové mikroskopie pozorovány nejen rozvětvené sítě dlouhých HA řetězců, ale také duplexní struktura, nazvaná jako dvoušroubovice. Výsledky měření potvrdily i jejich počítačové simulace a to přesto, že se jednalo o roztok HA v čisté vodě bez přítomnosti solí, kde by podle ostatních zdrojů k intermolekulární interakci vůbec docházet nemělo. Nebylo zde ovšem blíže specifikováno, o jaký typ šroubovice se jednalo. V pozdějším článku téže skupiny [25] byl na základě NMR popsán tvar jednotlivých řetězců vysokomolekulární HA (ve vodném roztoku s 0.29 M NaCl) jako páskám podobné helixy se dvěma disacharidovými jednotkami na jeden závit, připomínající spíše β skládaný list než klasickou šroubovici. Takto orientované řetězce však vzájemně hydrofobně interagovaly a vzniklé struktury byly poměrně stabilní – k jejich rozrušení došlo až mechanickým namáháním při míchání. Stejně páskám podobné helixy uspořádané do jakéhosi beta listu byly zkoumány výzkumnou skupinou E. Fishera (ve spolupráci se Scottovou skupinou) a to zejména z pohledu reologie a toho, jak velké smykové napětí je potřeba k rozrušení těchto struktur [26].

Vysokomolekulární HA byla charakterizována i pomocí AFM (mikroskopie atomárních sil). Dlouhé řetězce zde ve tvaru klubka tvořily mnoho různých kliček a smyček, které byly mnohdy stabilizovány antiparalelní intramolekulární interakcí, v některých případech téměř připomínající dvoušroubovici. Délka těchto duplexních úseků se pohybovala kolem 1 nm. Další podrobnosti o případných šroubovicích nebylo možné získat z důvodů limitací použité metody. [97]

Podle článku P. Gribbona a spol. [98] zaujímá HA tvar šroubovice pouze v přítomnosti Na^+ a Ca^{2+} iontů. Zajímavé je, že podle jejich zjištění (získaných fluorescenční zobrazovací technikou FRAP) má tato šroubovice v přítomnosti sodných iontů stoupání 4 disacharidové jednotky na závit, zatímco v přítomnosti vápenatých iontů jsou to jenom 3 disacharidové jednotky na závit. V uvedeném článku autoři také prohlašují, že neexistuje důkaz, že by mezi řetězci HA docházelo k jakékoliv intermolekulární interakci.

Výzkumy skupin Ch. Blundella i N. Yaffleye přítomnost terciární struktury vyvrací – první s pomocí NMR, druhá použitím Ramanovy spektroskopie. V obou případech se však jednalo pouze o HA ve vodném roztoku bez jakékoliv soli a proto je možné, že pokud tam k nějakým interakcím mezi řetězci docházelo, byly velmi slabé. [33,99] Naproti tomu skupina G. Giubertonové ve svém článku popisuje velký vliv terciární struktury HA na biologické vlastnosti [100]. Přestože infračervená spektroskopie nspecifikuje, o jakou terciární strukturu se zde jedná, je zde dokázána přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb. Práce se převážně zaměřuje na s nimi související pH iniciovanou gelaci.

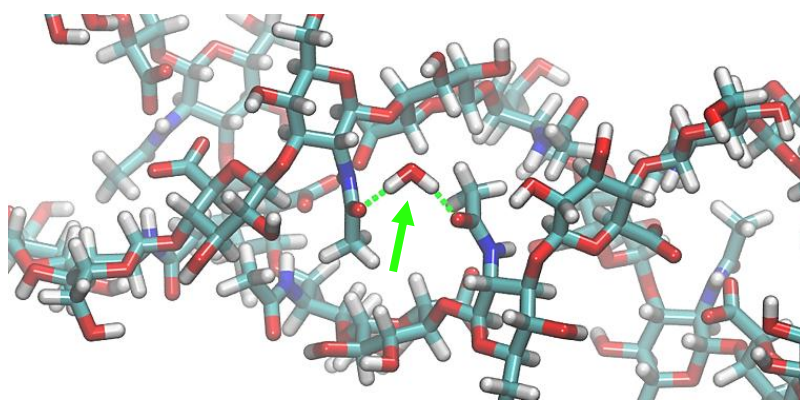
Tím, že případná terciární struktura HA je podle většiny zdrojů udržována nekovalentními interakcemi, je závislá na mnoha faktorech, a proto ji lze snadno ovlivnit a s ní i výsledné vlastnosti hyaluronanu. To lze vidět na případě denaturace HA, vyvolané zvýšením teploty. V tu chvíli dochází kromě změn v supramolekulární organizaci (terciární struktuře) také k výrazným změnám biologické aktivity a viskozity [20]. Kontrolou terciární struktury by pak mohlo být možné řídit specifické vlastnosti HA v biologických systémech, a tak ji uzpůsobit ke konkrétním aplikacím, zejména při dodávání léčiv nebo k využití ve tkáňovém inženýrství. [98]

4.1.6 Vlastnosti

Kyselina hyaluronová dosahuje vysokých stupňů polymerizace, čímž se liší od ostatních glykosaminoglykanů – její molekulová hmotnost se pohybuje v poměrně širokém rozmezí. V případě nízkomolekulární HA je to pouze několik kDa, zatímco vysokomolekulární HA může mít molekulovou hmotnost až 10 MDa. V lidském těle, konkrétně v synoviální tekutině, pak najdeme HA o hmotnosti mezi 3 a 4 MDa. Ve zbytku lidského těla se molekulová hmotnost HA liší podle konkrétního místa výskytu a také podle zdraví dané tkáně (v těch poškozených bývá HA kratší). [27,101,102]

Vysokomolekulární HA je viskoelastická, dobře zadržuje vlhkost a je mukoadhezní (schopná, přilnout k mukózním povrchům) – vlastnosti, které jsou žádoucí zejména v oftalmologii, ortopedii, kosmetice, nebo při hojení ran. Oproti tomu HA s nižší molekulovou hmotností podporuje angiogenezi (tedy tvorbu nových cév), ale také expresi zánětlivých mediátorů. Přítomnost krátkých řetězců hyaluronanu pak může signalizovat zranění. [83]

Mezi nejdůležitější vlastnosti HA, vztažené zejména k lidskému tělu, patří schopnost zadržovat vodu. HA je nejen schopná na sebe vodíkovými můstky navázat mnohem více vody, než jiné polymery (až tisícinásobek své hmotnosti), ale navázáním vody dokonce mění svou sekundární strukturu. Vytváří se zde jakési vodní mosty, propojující různé části molekuly nebo i různé řetězce HA, jak je vidět na Obr. 4 (je důležité podotknout, že zatímco na obrázku je pro přehlednost znázorněna jen jedna molekula vody, ve skutečnosti se jich v okolí řetězců nalézá mnohem více, a ty jsou mnohdy různě propojené, ať už mezi sebou, nebo právě s řetězcí HA). U obou forem HA – s navázanou vodou i bez ní – se vyskytují hydrofobní oblasti, důležité zejména pro případnou interakci s membránami nebo proteiny. Díky své schopnosti vázat vodu hraje HA významnou roli nejen v procesu hydratace tkání, ale také při udržování jejich pružnosti a pevnosti a v řadě dalších buněčných procesů. [103]



Obr. 4 – Vizualizace vodního mostu mezi HA řetězci, kdy jedna molekula vody tvoří dvě vodíkové vazby – na každý HA řetězec jednu.

Schopnost vázat se na proteiny je u HA velmi důležitá. Díky ní hraje roli ve struktuře ECM, kde ve spolupráci s proteiny podporuje konstrukci tkání. I proto se pak HA ve formě hydrogelů může využívat na přípravu scaffoldů nebo 3D kultivaci buněk (zejména po její modifikaci např. thiolací [35]). Hydrogely zde vytváří 3D prostředí, podobné přirozené tkáni, kterým pak prorůstají nové buňky. Při interakci s receptory na povrchu buněk nebo buněčné signalizaci je interakce s proteiny také nezbytná, stejně jako při aplikacích v dodávání léčiv. Tam jsou to právě proteiny, na které se HA v místě, kam je dodávána účinná látka, musí navázat. V těchto případech je HA mnohdy modifikovaná speciálně pro interakci s konkrétními proteiny, vyskytujícími se jen na daném místě. [27,88,104]

HA je citlivá na degradaci volnými radikály, což hraje roli v procesu stárnutí oka, zejména kvůli následné ztrátě viskozity a fragmentaci polymeru. Degradace nejčastěji probíhá na vazbách v N-acetylglukosaminu anebo začíná na vazbách C-H u kyseliny glukuronové (rozpad některé z těchto vazeb vede k přeuspořádání elektronů, a nakonec až k přerušení jedné z C-O vazeb polysacharidového cyklu). Tento proces může být inhibován určitými polysacharidy a má pravděpodobně vliv na stabilitu a funkci HA v tkáních, protože radikálovou degradací se HA štěpí na menší řetězce a tím se mění i její vlastnosti. [53,105,106]

Nízkomolekulární kyselina hyaluronová vykazuje antioxidační schopnosti díky přítomnosti karboxylových skupin, které s případnými radikály mohou interagovat. Nejen, že při testech *in vitro* i *in vivo* prokázala silnou schopnost inhibice lipidové peroxidace, ale dokáže odstraňovat i reaktivní kyslíkové skupiny, jako jsou hydroxylové radikály (tím, že s nimi reaguje) [107]. I vysokomolekulární HA má antioxidační vlastnosti a účinně omezuje pohyblivost reaktivních radikálů, zejména pokud se ještě modifikuje naroubováním benzylových skupin [108]. Antioxidační schopnost lze také podpořit expozicí řetězců gama záření, čímž se ještě zkrátí,

dochází ke vzniku dalších struktur, jako jsou pyranokarboxylové kruhy, které jsou schopné redukovat komplexy HA s nejrůznějšími kovy [109].

Otázka, jestli je HA jako taková schopná samoorganizace, nebyla doposud uspokojivě zodpovězena. Zdá se, že za specifických podmínek tvoří HA hydrofilní a hydrofobní oblasti, kde mohou vznikat duplexní struktury, nebo případně dokonce dvoušroubovice, jak bylo diskutováno v předchozí kapitole. Za běžných (fyziologických) podmínek však nejspíše k samoorganizaci nedochází (nebo jen ve velmi malé míře), protože v takovém případě by HA musela být méně rozpustná a také by musela tvořit gelové struktury (minimálně při vysokých koncentracích) [110].

Vlastnosti HA v roztoku

Vlastnosti HA roztoku lze nejlépe popsat jednoduchým hydrodynamickým modelem řetězců, zpevněných intramolekulárními vodíkovými vazbami. Ty mohou být narušovány okolním solvatačním obalem, kdy voda v blízkosti molekuly vytváří jakousi dynamickou klec. Stabilitu molekuly pak zprostředkovává právě solvatační obal a vodíkové vazby mezi HA a vodou v okolí. Mimo to tento obal usnadňuje biologickou aktivitu a interakce HA s proteiny či jinými biomolekulami. [30]

Roztoky HA vykazují významné viskoelastické chování – i malé segmenty mají měřitelnou viskozitu. Vliv na ni má mnoho různých faktorů, jako je třeba teplota, koncentrace hyaluronanu v roztoku, nebo délka řetězce. Díky viskozitě pomáhá HA snižovat tření mezi kolagenovými vlákny, chrání oční tkáň před poškozením a v kosmetických aplikacích pak také upravuje texturu a vlastnosti nejrůznějších masťů a krémů. Studium změn viskoelastických vlastností za různých podmínek se také může využívat k výzkumu a detekci případných nevazebných interakcí v roztoku HA. [111]

Ve vysoce koncentrovaném roztoku hyaluronanu se tvoří vnitřní struktury, a tudíž dochází i ke změně reologických vlastností. Kromě toho, že se řetězce fyzikálně zamotávají do sebe, dochází také k hydrofobní interakci mezi nepolárními postranními skupinami HA a vytváří se tak jakási krátkodobá polymerní síť. Ta dodá roztoku gelovitou strukturu, ale je poměrně snadno rozrušitelná změnou teploty. Při nižší koncentraci HA může také docházet k tvorbě dočasné sítě, ale pouze díky fyzikálním interakcím, kdy řetězce si i v takovémto případě zachovávají pohyblivost a ke vzniku pevnějšího gelu nedochází. [112]

Protože HA je snadno disociovatelná a velmi často se vyskytuje v podobě polyaniontu, má na její konformaci v roztoku významný vliv nejen pH, ale obecně také přítomnost iontů. Přestože za fyziologických podmínek elektrostatické efekty nejsou moc velké, bylo na toto téma provedeno několik výzkumů. [22,98]

Roztok hyaluronátu sodného a chování HA v takovémto roztoku lze popsat pomocí kombinace dvou teorií: teorie Yamakawa-Fujii-Yoshizaki pro neporušené řetězce [113,114] a teorie Yamakawa-Stockmayer-Shimada pro objemové efekty [115–117]. I podle studie E. Fouissaca a spol. [118] má iontová síla roztoku významný vliv na velikost klubka. Konkrétněji je zde popsáno, že při zvýšení koncentrace soli dochází ke snížení gyračního poměru (fakt, který byl několikrát ověřen jak experimentálně, tak pomocí molekulárně dynamických simulací [119,120]). Z dalších výzkumů chování HA v elektrolytech vyplývá, že každá sůl ovlivňuje roztok HA trochu jiným způsobem. Například přítomnost vápenatých iontů má podstatně větší vliv než ionty sodné, zatímco jiné ionty (Mg^+ , K^+) ovlivňují HA ještě méně než Na^+ .

Obecně platí, že přítomností jakýchkoliv kationtů v okolí HA je odstíněn celkový náboj, a proto také klesá elektrostatická odpuzivost jednotlivých částí řetězce. Ovlivněna je i ohebnost, protože intramolekulární vodíkové vazby mezi sousedícími monosacharidovými jednotkami (které řetězec za běžných podmínek zpevňují) jsou rozrušeny tím, že boční skupiny (zejména karboxylová, ale i OH skupiny na druhé straně monosacharidového cyklu na uhlících 2 a 3) upřednostňují interakci s ionty. Tyto faktory pak umožňují také tvorbu dalších nekovalentních interakcí mezi vzdálenějšími částmi řetězce (nebo dokonce i mezi různými řetězci). [98,120]

Změny v chování HA v elektrolytech mají klíčovou roli ve tkáňovém inženýrství nebo při dodávání léčiv. Přítomnost iontů totiž ovlivňuje nejen permeabilitu, ale i mechanické vlastnosti. Samotné ionty, třeba Ca^{2+} v poškozených kostech, by mohly působit jako cíl nosičů léčiv na bázi HA. [22,121]

Intramolekulární zpevňující vodíkové vazby mezi sousedními monosacharidy mohou být rozrušeny také změnou pH. Například v zásaditém roztoku se velikost náhodných klubek díky tomuto efektu významně snižuje a HA je vysoce pohyblivá a permeabilní, což by v budoucnu mohlo vést k využití pH-citlivých hydrogelů pro kontrolované dodávání léčiv. [22]

4.1.7 Aplikace kyseliny hyaluronové v praxi

Největší využití má HA v lékařských a kosmetických aplikacích. V medicíně se například využívá jako viskosuplement k léčbě osteoartrózy – degenerativního chronického onemocnění kloubů, které postihuje miliony lidí na celém světě. V takovém případě se kyselina hyaluronová podává intraartikulárně, tedy přímo do kloubu, kde podporuje tvorbu vlastní kloubní tekutiny a změkčuje nárazy. Účinnost léčby je naneštěstí ovlivněna mnoha faktory, mimo jiné také stupněm osteoartrózy či věkem pacienta [122]. Další možností je využití hyaluronanových nanočástic, které by se mohly dát konkrétně zacílit a působit tak přímo na postižené místo kloubu. Tam

by díky své odolnosti a dlouhé životnosti mohly být dlouhodobějším řešením problému [123].

Lineární HA má velký potenciál také v systémech pro dodávání léčiv (byť mnoho studií zatím proběhlo jen *in vitro*) zejména proto, že je přirozenou složkou lidského těla a tak by neměla vyvolávat imunitní reakci. Aktuálně je potřeba vyvinout nové materiály, případně modifikovat HA tak, aby mohla být v tomto ohledu lépe použita ve specifických aplikacích. I proto se v současné době velké množství výzkumů HA (včetně této práce) zabývá jejími modifikacemi. [2]

Předmětem mnoha současných výzkumů je i aplikace HA v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně, například jako scaffold pro regeneraci chrupavky, nebo k dodávání kmenových buněk na podporu regenerace tkání. Systémy na bázi HA by mohly nejen účinně dodat léčivo přímo do popáleniny nebo rány, ale mohly by jej uvolňovat postupně, čímž by se snížila nutnost léčbu opakovat, minimalizovala by se možnost sekundárních infekcí a zlepšilo by to i celkový komfort pacienta. [124,125]

Velký potenciál mají také hydrogely, založené na hyaluronanu, a to nejen při dodávání léčiv. Pro intraokulární léčbu se využívá čistý HA gel, ale také různé modifikované varianty, jako jsou hydrogely na bázi hydrazonu, kolagenu (ty se využívají pro léčbu rohovky) nebo právě hyaluronanu, dále pak thioly modifikované hydrogely, aplikované zejména při očních poraněních [34,126,127]. Pro léčbu různých poruch sluchu byl zkoumán liposomový HA gel [36]. V tomto případě se ale HA používá i ve formě roztoku [128]. Hydrogely, kombinované s dalšími účinnými látkami jako jsou třeba kortikosteroidy, mohou být dále využity pro léčbu kloubů [129]. Hyaluronan ve formě gelu je navíc hojně využíván i v estetické medicíně na dermální výplně při nechirurgických operacích měkkých tkání (jako jsou rty nebo prsa) [130].

Jak už bylo zmíněno výše, HA se ve formě viskoelastického gelu využívá také při mnoha oftalmologických operacích (zejména pro ochranu tkání před chirurgickými nástroji, pomoc při hojení, ale také poskytnutí manipulačního prostoru při operacích [130,131]) a jako součást očních kapek. Díky mukoadhezivitě hyaluronanu vydrží kapky v oku déle a HA interaguje přímo s buněčnou stěnou rohovky, díky čemuž je ideální pro dodávání léčiv do oka. Zvyšuje totiž nejen účinnost léčiv, ale také zvlhčuje a lubrikuje oční tkáň. [132–134]

Zkoumá se i potenciální využití HA při léčbě rakoviny. Protože HA se vyskytuje v nádorech i v jejich okolí v hojné míře (jak bylo diskutováno v podkapitole 4.1.2), mohlo by se její přítomnosti využít k zacílení léčby přímo na konkrétní místo. Za tímto účelem byly zkoumány modifikované hyaluronanové nanočástice, které díky své velikosti snadno projdou tělem a usadí se na nádorové tkáni mnohem efektivněji

než delší HA řetězce. Polyethylenglykol, kterým jsou tyto částice modifikovány, je navíc stabilizuje, což zvyšuje pravděpodobnost dodání léčiva tam, kam je potřeba [135].

Podle výzkumné skupiny X. Tiana by mohla silně vysokomolekulární HA, nalezená u rypošů lysých, dokonce aktivně působit proti rakovině. EHMW-HA (extra-vysoko-molekulární-HA) má molekulovou hmotnost až 6 MDa a na rakovinové buňky má nejen inhibiční účinek, ale přímo způsobuje jejich apoptózu (řízenou buněčnou smrt). [136] Tyto poznatky by mohly vést k vývoji nových léčebných metod, založených na EHMW-HA, jak potvrdilo hned několik následných výzkumů. Všechny jsou však ještě velmi daleko od reálného podání léku pacientovi. [137,138]

Další možná využití modifikovaných hyaluronanových nanočástic jsou pak pro léčbu astmatu, retinální neovaskularizace, diabetické retinopatie nebo jako nosiče hydrofobních léčiv [3,39]. Hyaluronan obecně se dále využívá (nebo je zkoumáno jeho budoucí možné využití), při chirurgickém remodelování poraněné nosní sliznice [139], nebo pro zmírnění podráždění kůže, zejména po operacích. Také pro léčbu zánětlivých onemocnění dásní a léčbu paradentózy má HA velký potenciál [140], stejně tak při podpoře angiogeneze v případě nedostatečného prokrvení, způsobujícího tvorbu vředů na nohou [141]. HA má potenciál i v urologii, a to pro léčbu infekcí, mimo jiné chronické bakteriální cystitidy či hemoragické cystitidy, kdy HA buď samostatně nebo v kombinaci s alfa blokátory chrání sliznici močového měchýře a zmírňuje příznaky infekce [142,143].

Z důvodů problémů s používáním albuminu se začala kyselina hyaluronová využívat také při IVF (*in vitro fertilisation*) jako médium pro kultivaci a transfer embryí. Albumin získaný z krve totiž může přenášet infekční onemocnění, jako je třeba hepatitida B. Hyaluronan naproti tomu má všechny potřebné vlastnosti, ale dá se získat z jiných zdrojů než živočišných, takže tady nehrozí nebezpečí přenosu nemoci. Všechny ostatní důležité podmínky jsou ovšem splněny. [144]

HA může být také použita pro modifikace liposomů, kdy vzniklé magnetické nanočástice mohou být aplikovány jako nosiče léčiv při léčbě rakoviny prsu [145]. Liposomy modifikované HA jsou ideálními nosiči, protože zvyšují stabilitu dodávaných látek v krevním řečišti, prodlužují jejich životnost, snižují toxicitu systému [38], zvyšují průchodnost tkáněmi a celkově zlepšují účinky dopravovaného léčiva díky synergetickému efektu [37].

Kromě medicíny a farmacie má HA velké využití také v kosmetice. Díky svému přirozenému výskytu v pokožce a tomu, jakou v ní má funkci, se HA přidává zejména do krémů na pleť, různých přípravků proti stárnutí, pro podporu zvlhčování kůže a podobně. Hyaluronan také dokáže ochránit kůži proti UV záření, a proto se využívá

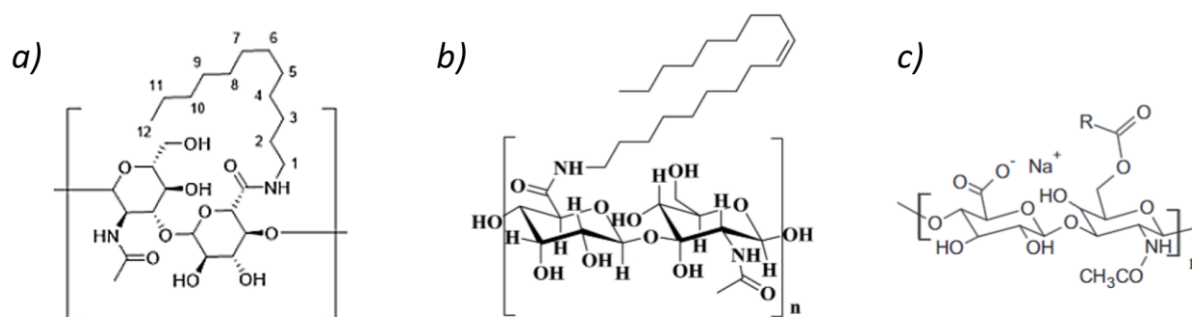
do opalovacích krémů [146]. Ve formě injekcí se HA může vpichovat přímo do vrásek a figurovat jako jejich výplň, podobně jako kolagen, který HA zvolna nahrazuje, zejména svou lepší cenovou dostupností. [147–149]

V posledních desetiletích se HA začala využívat také jako doplněk stravy. Po požití je střevními bakteriemi degradována na oligosacharidy, které jsou absorbovány v tlustém střevě a následně jsou krví dopravovány až do kůže, kde působí podobně, jako by byly dodány topicky [150]. HA se však dostává také do jiných částí těla, jak naznačuje studie, kde pacienti po podání HA registrovali zmírnění bolesti způsobených osteoartrózou kolen [151].

4.2 Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci

Hydrofobizací kyseliny hyaluronové je možné nejen snížit její rozpustnost ve vodě, ale také prodloužit její životnost. Prostřednictvím hydrofobních interakcí se navíc řetězce takto modifikované HA ve vodném prostředí shlukují do domén, ve kterých je možné rozpustit hydrofobní léčiva. V důsledku toho má takto modifikovaná HA velké využití, zejména právě jako nosič léčiv [2,3,152] nebo také v oftalmologii [5].

Samotná modifikace se obvykle provádí v organických rozpouštědlech (formamid [44], dimethylformamid [1], ale také tetrahydrofuran, 1,4-dioxan nebo terc-butanol [153]) za přítomnosti katalyzátorů a dalších látek ovlivňujících reakci. Nejčastějším místem, kam se alifatický řetězec váže, je karboxylová skupina GCU (ukázka možných variant takovéto modifikace je na Obr. 5a a 5b). Karboxylová skupina kyseliny glukoronové je cílem modifikací také při thiolaci i jiných chemických reakcích [35].



Obr. 5 – HA modifikovaná (a) dodecylaminem [1], (b) oleylaminem [44] a (c) esterifikací mastnými kyselinami [3]

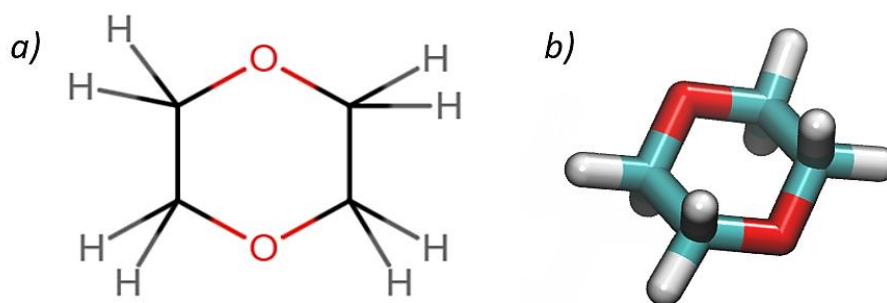
Hydrofobní HA lze získat také její esterifikací s alkylátovými mastnými kyselinami (Obr. 5c), konkrétně např. s kyselinou dodekanovou nebo stearovou.

V takovém případě reakce nejčastěji probíhá na šesté alkoholové skupině N-acetylglukosaminu. Stejně jako u výše uváděných modifikací, i zde se mění jak chemická reaktivita řetězců, tak i jejich rozpustnost a stabilita v různých prostředích. Modifikace navíc ovlivňuje i případnou adhezi, biodegradabilitu a mechanickou pevnost materiálů, vyrobených z takto upravené HA. [3,6]

4.3 Směsná rozpouštědla

4.3.1 Směs vody a 1,4-dioxanu

Dioxan, nebo také dioxacyklohexan je organické rozpouštědlo, patřící do skupiny cyklických etherů. Je dobře rozpustné ve vodě a odolné vůči biodegradaci [154]. Má tři izomery: 1,2-dioxan, 1,3-dioxan a 1,4-dioxan (viz Obr. 6), který se díky své energetické stabilitě vyskytuje a využívá nejčastěji.



Obr. 6 – Struktura 1,4-dioxanu (a) a jeho vizualizace v MD simulaci (b)

Molekula 1,4-dioxanu je symetrická, a stejně jako u mnoha dalších cyklů je její energeticky nejvýhodnější konformace židličková. Její vlastnosti (např. dipólový moment) jsou konzistentní bez ohledu na okolní prostředí – vykazuje velmi podobné chování ve vodě, i v nevodných rozpouštědlech o různé polaritě. [155]

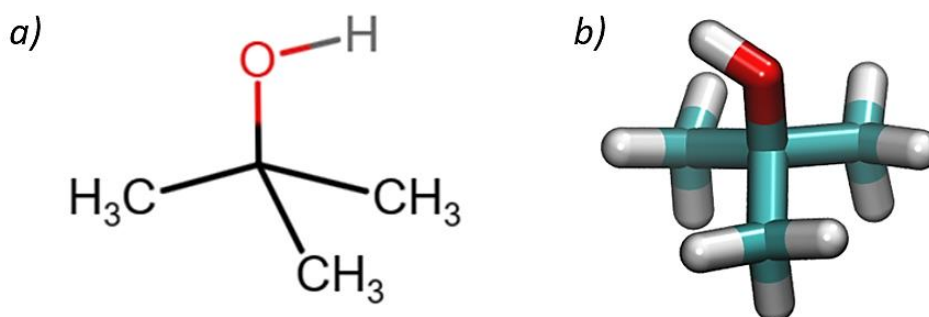
Ve směsích s vodou dioxan narušuje vodíkové můstky mezi molekulami vody, čímž mění vlastnosti i chování těchto roztoků. Tato funkce dioxanu byla v minulosti zkoumána *in silico* (tedy pomocí počítačových simulací), kde byl také podrobněji popsán způsob, jakým se voda a dioxan mísí [155].

Směs voda:dioxan se využívá v mnoha oblastech vědy a průmyslu. Nejčastěji jako rozpouštědlo pro organické reakce, extrakce a syntézy. Dále se směsi vody a dioxanu mohou využívat při chromatografii, při výrobě kosmetických či farmaceutických produktů a v průmyslu také jako čisticí prostředek pro odstraňování mastnoty nebo nečistot z povrchů. [156]

V poslední době se o dioxanu mluví v souvislosti s jeho možnou karcinogenitou a hledají se metody, jak jej ve vodních zdrojích (kam se i přes veškerá bezpečnostní opatření dostává) rozpoznat a odstraňovat. [154]

4.3.2 Směs vody a terc-butanolu

Terc-butanol (systematicky 2-methylpropan-2-ol) je bezbarvá olejovitá látka se silným pachem. Toto rozpouštědlo je relativně dobře mísitelné s vodou i s ethanolem. Protože se jedná o terciární alkohol (viz Obr. 7), je oproti ostatním izomerům butanolu méně náchylný k oxidaci a méně reaktivní. V průmyslu se využívá zejména jako surovina pro výrobu dalších produktů, ale v některých případech i jako organické rozpouštědlo. [157,158]



Obr. 7 – Struktura terc-butanolu (a) a jeho vyobrazení v simulaci (b)

Ve směsi s vodou terc-butanol tvoří mikrodomény (podstatně výraznější, než je možné najít při mísení vody a dioxanu) – kromě běžné koncentrační fluktuační v objemu směsi (způsobené jednotlivými molekulami) je zde totiž možné pozorovat i větší ‚domény‘ bohaté na terc-butanol a ‚domény‘, bohatší na vodu. Tyto mikrofáze jsou dobře patrné zejména z grafů radiální distribuční funkce nebo při výpočtu Kirkwoodových-Buffových integrálů [47,159], ale také pomocí rentgenového nebo neutronového rozptylu [48,160].

I kvůli výrazné tendenci k fázové separaci rozpouštědla jsou simulace směsi vody a terc-butanolu náročné na provedení a je obtížné odhadnout, jak velký musí být simulovaný systém, aby v něm vzniklé mikrodomény odpovídaly realitě. I proto bylo takovýchto výzkumů a simulací provedeno poměrně hodně, a to jak s kompletním all-atom modelem, tak také se zjednodušenou variantou (united-atom) bez vodíků. Žádná simulace však zatím uspokojivě nevysvětlila, proč se v terc-butanolu mikrodomény tvoří. [159–162]

4.4 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika (MD) je simulační metoda pro predikci chování molekul v čase. Metoda pracuje na principu Newtonových pohybových rovnic (1) pro jednotlivé atomy, kterým jsou pomocí statistických principů (konkrétně Maxwelllova-Boltzmannova rozdělení) náhodně přiřazeny rychlosti.

$$\mathbf{F}(t) = m \frac{d^2 \mathbf{r}(t)}{dt^2} \quad (1)$$

kde $\mathbf{F}(t)$ je vektor výsledné síly působící na molekulu v čase t , m je její hmotnost a $\mathbf{r}(t)$ je vektor její polohy v čase t .

Pro výpočet vzájemného působení mezi částicemi (zde atomy a molekulami) je pak pomocí rovnice (2) možné získat potenciál U .

$$U(\mathbf{r}) = - \int \mathbf{F}(\mathbf{r}) \cdot d\mathbf{r} + C \quad (2)$$

kde $U(\mathbf{r})$ je potenciální energie molekuly v poloze \mathbf{r} , $\mathbf{F}(\mathbf{r})$ je vektor síly, působící na molekulu v této poloze a konstanta C představuje potenciál v referenční pozici.

První simulace (jednalo se o výzkum dynamiky vzácných plynů) byly prováděny už v padesátých letech výzkumnou skupinou B. Adlera [163], v roce 1977 pak J. McCammon a spol. publikovali výsledky prvních simulací komplexnějších molekul – proteinů [164]. Od té doby narůstá využití MD téměř exponenciálně, kdy v posledních desetiletích se simulují nejen proteiny a enzymy, ale také polysacharidy, biomembrány, lipidy a další biomolekuly. [165]

Obecně platí, že MD simulace jsou velmi užitečným nástrojem nejen pro studium struktury a dynamiky molekul, ale také jejich vzájemných interakcí (jako jsou vodíkové vazby, elektrostatické síly nebo van der Waalsovy interakce). Pomocí MD je také možné navrhovat nové materiály nebo predikovat vlastnosti nových molekul. [165]

4.4.1 Princip MD simulací

Atomy, reprezentované sférickými částicemi se specifickými van der Waalsovými (VdW) poloměry a náboji (lokalizovanými v jádrech jednotlivých atomů), jsou umístěny v simulačním prostoru. Pomocí Maxwelllova-Boltzmannova rozdělení jsou jednotlivým atomům náhodně přiřazeny vektory rychlostí, což umožňuje predikci jejich pohybu v čase na základě Newtonových pohybových rovnic.

Silová, resp. potenciálová pole jsou s ohledem na výpočetní náročnost nejčastěji reprezentována párovými potenciály, jejichž základní parametry pocházejí z experimentů a kvantových výpočtů. Dělí se na vazebné (pnutí vazeb, kmitání vazebných úhlů, rotace torzních/dihedrálních úhlů) a nevazebné (elektrostatické a VdW interakce). Mezi VdW interakce pak patří zejména disperzní síly, jejichž nejlepším modelem je Lennard-Jonesův potenciál. Silová pole popisují všechny výše uvedené interakce, dále tuhost a délku jednotlivých pružinami reprezentovaných vazeb a definují i další parametry, jako jsou částečné atomové náboje.

Pro účely MD existuje několik různých druhů silových polí s podobnou mírou přesnosti a shody s experimentem. Každé z nich má své specifické výhody a aplikace: [166]

- **CHARMM** (Chemistry at HaRvard Macromolecular Mechanics) [167] – pokrývá většinu běžně simulovaných menších molekul a umí popsat i složitější makromolekuly
- **AMBER** (Assisted Model Building with Energy Refinement) [168] – využívá se zejména pro simulace proteinů a DNA, podporuje neexplicitní modely (tzv. united atom modely, kde atomy nejsou vždy reprezentovány jednotlivě, ale někdy jen jako jedna skupina, př. CH₃ místo uhlíku a jednotlivých vodíků), typově velmi podobné CHARMM
- **GROMOS** (GRoningen MOlecular Simulation) [169] – efektivní simulace větších biochemických molekul (proteinů, lipidů, nukleových kyselin, enzymů a dalších biopolymerů) ale i menších molekul, jako je voda či organická rozpouštědla
- **OPLS** (Optimized Potentials for Liquid Simulations) [170] – zaměřené zejména na kapaliny a jejich nevazebné interakce, jelikož je kompatibilní s AMBER, využívá se také jejich kombinace AMBER/OPLS
- **X-PLOR** (X-ray eXPLOration) [171] – pro interakce mezi jednotlivými atomy v molekulách, často aplikováno pro analýzu struktur bílkovin v rentgenové krystalografii

Přestože kvůli kmitání atomů a dalším faktorům musí být simulační krok jen velmi malý (řádově femtosekundy, tedy 10^{-15} s), pokrok ve výpočetní technice dnes umožňuje simulovat procesy o délce nanosekund i mikrosekund, přičemž výpočet trvá řádově jen jednotky dní (pochopitelně však záleží na velikosti simulovaného systému a výpočetní kapacitě použitých počítačů). [165]

Přestože v některých silových polích je možné počítat i s polarizovanými molekulami (u nichž se může měnit distribuce náboje v rámci molekuly), velkou nevýhodou MD je, že za obvyklých podmínek není schopná simulovat výměnu nebo redistribuci náboje mezi molekulami. Kvůli harmonické aproximaci pnutí vazeb navíc nelze simulovat jejich rozpad². Pro simulace chemických reakcí je proto potřeba využít komplikovanější kvantově chemické výpočty [172].

4.4.2 Software NAMD 2.0

Software NAMD (NAnoscale Molecular Dynamics) je široce využívaný paralelní kód pro molekulárně dynamické simulace biochemických systémů. Byl vyvinut na Illinoiské univerzitě v Urbana-Champaign v Backmanově institutu pro pokročilé vědy a technologie a jeho vývoj neustále pokračuje (v únoru 2024 byla vydána verze NAMD 3.0). K výpočtům využívá stovky procesorových jader pro obvyklé simulace a více než 500 000 jader pro ty největší systémy. [173]

Program je volně dostupný (včetně zdrojového kódu) a byl mimo jiné dvakrát oceněn cenou Gordona Bella (cena, udělovaná za mimořádné úspěchy v oblasti výpočetních clusterů a paralelního počítání). Kompatibilní silová pole jsou CHARMM, AMBER a X-PLOR. [173]

V České republice jej lze snadno využívat díky virtuální organizaci MetaCentrum. Ta je otevřená všem akademickým pracovníkům, zaměstnancům i studentům vědecko-výzkumných institucí a zprostředkovává přístup k síti superpočítačů, na nichž je možné provádět výpočty. [174]

4.4.3 Software VMD

Jedním z nejvyužívanějších softwarů pro modelování, analýzu a vizualizaci výstupů simulací je program VMD (Visual Molecular Dynamics). Tento software byl původně vyvinut pro práci s proteiny, ale dnes se využívá pro všechny typy molekul – od polysacharidů přes lipidové vrstvy až po nukleové kyseliny. Základní funkce jsou dostupné pomocí grafického uživatelského rozhraní, širší využití je možné přes rozhraní TK console nebo přímo přes příkazový řádek. [175]

VMD poskytuje množství metod pro zobrazení molekul, jejich barevné rozlišení, ale také dokáže kolem zobrazených biomolekul přidat molekuly vody, nebo spojovat několik zobrazených struktur do jednoho systému. Navíc dokáže vypočítat jednoduché analýzy a charakteristiky (měření úhlů a vzdáleností v rámci molekuly,

² Místo klasické potenciálové křivky energie chemické vazby je zde použita parabola. Tím je ovšem dána maximální vzdálenost mezi interagujícími atomy. Které tak nemají možnost se od sebe vzdálit.

zobrazení distribučních funkcí či míry interakce mezi molekulami a mnoho jiného). Díky příkazovému rozhraní TK console je pak možné vytvářet další funkce formou skriptů. [175]

4.4.4 Model vody TIP3P

Pro molekulárně dynamické simulace neexistuje žádný univerzální model vody, a proto se využívá mnoho různých typů. Každý z nich je něčím specifický a je třeba z nich zvolit ten pravý dle typu konkrétní simulace.

Model TIP3P (Transferable Intermolecular Potential with 3 Points) patří k nejpoužívanějším. Jeho parametry byly sestaveny tak, aby reprodukovaly entalpii vypařování a hustotu kapalně vody za běžných podmínek. Vazba mezi kyslíkem a vodíky je zde 0.9572 Å, úhel mezi vazbami H-O-H je 104.52° a kmitání jak vazeb, tak úhlu, je v zájmu zjednodušení výpočtů zanedbáno. Tento model má svá omezení zejména v oblasti nízkých teplot při simulacích pevných fází vody (má nižší teplotu tání ledu, než jiné modely). [176]

Při srovnání s experimentem má model TIP3P velmi dobré výsledky, zejména je-li v systému jen voda. Přestože tento model není ideální, pro simulace větších molekul v prostředí směsných rozpouštědel je dostačující. Účel simulace totiž není zcela přesná vzájemná distribuce částic rozpouštědla, ale jeho interakce s molekulou a pro interakce s většími molekulami je TIP3P poměrně spolehlivý. TIP3P je navíc výchozím modelem silového pole CHARMM a i díky tomu jsou výpočty s jeho pomocí velmi rychlé.

Mezi další používané modely patří:

- **SPC/SPCE** (Extended Simple Point Charge) je také třibodový (jeden bod za každý atom), ale s mírně upravenými parametry a náboji na vodíkových atomech, které lépe odpovídají experimentálním výsledkům. Díky tomu vytváří silnější vodíkové vazby a pevnější struktury, lépe reprodukuje hustotu, dielektrickou konstantu i jiné fyzikální vlastnosti vody. Je však o něco náročnější na výpočet, proto se využívá zejména při simulacích membrán, bílkovin a dalších systémů, kde je potřeba velmi přesný popis chování vody. [177]
- **TIP4P** a **TIP5P**, které mimo tři atomů tvořících molekulu vody zavádí ještě bod(y) s parciálním nábojem volných elektronových párů na kyslíku. To umožňuje lepší distribuci elektrického náboje a přesnější zachycení tetraedrické struktury vody. S počtem přidanych bodů ovšem roste i výpočetní náročnost takovýchto modelů. [176]

- **OPC** (Optimal Point Charge) – je čtyřbodový model, podobně jako TIP4P, ale jeho geometrie je omezena pouze symetrií. Rozmístění nábojů a parametrů vychází z experimentálních dat a kvantové chemie. Výpočetní náročnost je srovnatelná s TIP4P, ale vlastnosti vody jsou zde zachyceny s ještě o něco vyšší přesností, než mají TIP modely. [178]

5. Metody

V rámci disertační práce byly při teplotě 298.15 K a tlaku jedné atmosféry simulovány oligomery disociovaného hyaluronátu sodného o délce dvaceti (resp. čtyřiceti osmi) monosacharidových jednotek. Dále byly simulovány HA řetězce, na které byly naroubovány alifatické zbytky kyseliny stearové (18 uhlíků). Substituenty byly navázány na OH skupinu na šestém uhlíku NAGu po vzoru předchozích výzkumů na toto téma [6]. Detaily vazby jsou podrobněji popsány v kapitole 6.3 – Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci.

5.1 Parametry simulací

Protože v praxi substituční reakce probíhá v prostředí směsných rozpouštědel a protože, jak bylo zmíněno v teoretické části, právě směsi voda:dioxan a voda:terc-butanol ovlivňují dynamiku řetězce zatím ne zcela popsáním způsobem, byla tato dvě prostředí použita i v tomto výzkumu. Do všech systémů byly přidány sodné ionty (za účelem neutralizace záporně nabitého HA) a několik různých koncentrací disociovaného NaCl. Značení jednotlivých simulačních prostředí používané v této práci je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1 – V textu používané značení simulačních prostředí

$c_{\text{NaCl}} / \text{M}$	voda	voda:dioxan	voda:terc-butanol
0	w_0M	w:d_0M	w:t_0M
0.1	w_0.1M	w:d_0.1M	w:t_0.1M
0.2	w_0.2M	w:d_0.2M	w:t_0.2M
0.6	w_0.6M		
1	w_1M		

Při tvorbě simulačního systému byla nejprve optimalizována samostatná směsná rozpouštědla v malých simulačních boxech o hraně 40 Å (viz Obr. P1), vytvořených s využitím softwaru PACKMOL [179]. Ty pak byly při solvataci naskládány okolo

molekuly (resp. molekul) tak, aby bylo ve vzniklém (přibližně krychlovém) simulačním boxu dost prostoru pro její (resp. jejich) pohyb. Boxy pro menší systémy, jako byly například samostatné alifatické řetězce, měly délku hrany jen cca 90 Å. U velkých systémů se dvěma substituovanými řetězci HA dosahovala hrana boxu i 160 Å.

Po vytvoření simulačního boxu a umístění všech molekul byla po dobu 5–10 ps minimalizována energie. Při každé simulaci bylo také nutné aplikovat periodické okrajové podmínky (aby byly výsledky co nejméně ovlivňovány hranicí simulačního boxu) v izobaricko-izotermální (NPT) soustavě. Tlak byl řízen pomocí Langevinova pístu a Nosého-Hooverovy metody, teplota pomocí Langevinova termostatu.

Samotné simulace pak byly prováděny prostřednictvím virtuální organizace MetaCentrum s využitím softwarů PuTTY a NAMD 2.10. Topologie sacharidů a další parametry byly převzaty ze silového pole CHARMM36, konkrétně z rozšíření CGenFF pro organické látky, zatímco pro simulace vody byl využit model TIP3P. Časový krok byl 1 fs pro interakce vazebné a 2 fs pro nevazebné s cut-off vzdáleností nevazebných interakcí 10 Å. Každých 6 fs byly provedeny kompletní elektrostatické výpočty pomocí metody Particle Mesh Ewald (PME) a každých 3600 fs byly ukládány souřadnice všech atomů (případně každých 1800 fs u větších systémů).

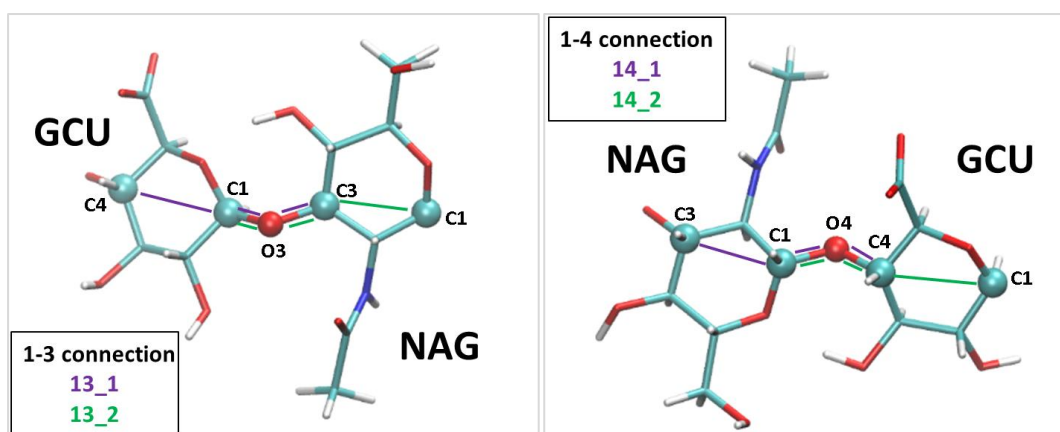
5.2 Charakterizace výsledků

Pro vizualizaci a základní vyhodnocení výsledků byl využit software VMD. V něm byly vytvořeny i všechny vizualizace, použité v této práci. Na většině obrázků v práci je řetězec HA zbarven dle tradičního značení – atomy kyslíku jsou červeně, vodík bílou barvou, dusík modrou, sodík žlutou, chlor zelenou a uhlík je znázorněn tyrkysově. Pro zobrazení řetězců je nejčastěji využíván model „lékořice“, pro ionty vyobrazení pomocí Van der Waalsova poloměru. Organické molekuly jsou zde znázorněny oranžovou (dioxan) a zelenou (terc-butanol) barvou pro zachování konsistence s již publikovanými výsledky. Toto barevné značení je využíváno i v grafech.

S pomocí VMD byly vyhodnocovány i radiální distribuční funkce nebo počty vodíkových vazeb (HB). Ty byly v programu VMD definovány pomocí vzdálenosti záporně nabitých atomů, tedy např. kyslíku sloužícího jako akceptor a kyslíku z OH skupiny, jejíž vodík sloužil jako donor, (max. 3 Å) a úhlu, který tyto tři atomy svíraly (min. 160°). Kromě celkového počtu intermolekulárních vodíkových vazeb mezi dvojicemi HA řetězců byla také sledována statistika, které skupiny se těchto vazeb účastní.

Další charakteristiky (jako je vzdálenost konců nebo počet atomů v blízkosti HA molekul) byly získávány s pomocí tcl skriptů. Tak byla určována vzdálenost konců řetězců, definovaná jako vzdálenost atomů na opačných stranách řetězce (dle značení na Obr. 9 šlo o kyslíky C5 na GCU a O3 na NAG, případně o uhlíky C1 na GCU a C4 na NAG). Tcl skripty byly využívány i pro vyšetření množství iontů a konkrétní složky rozpouštědla v blízkosti řetězců, případně množství atomů HA páteře v blízkosti alifatických substituentů.

Výpočty, které byly pro VMD nebo krátké skripty příliš komplikované, byly programovány manuálně v programovacím jazyce Python. Kód byl napsán v programovacím prostředí SPYDER (The Scientific Python Development Environment) [180] s využitím knihovny MDAnalysis [181]. Programy vyšetřovaly pozice sledovaných řetězců vůči sobě a v případě, že se řetězce příliš vzdálily a vlivem periodických okrajových podmínek se tak k sobě přiblížily z opačné strany, byl jeden z nich přesunut tak, aby jeho poloha odpovídala tomuto přiblížení. To bylo obzvláště důležité při určování charakteristik, popisujících vzájemné interakce řetězců. Takto byly vyhodnocovány zejména: střední vzdálenost řetězců D_{MD} (podrobněji popsána níže), rotace dihedrálních úhlů na glykosidických vazbách (viz Obr. 8) nebo počet iontových a vodních mostů (Ibr, Wbr) mezi HA řetězci³. Python byl použit také pro vyšetření způsobu přiblížení řetězců (viz kapitola 6.3.3 – Orientace substituentů v prostoru).

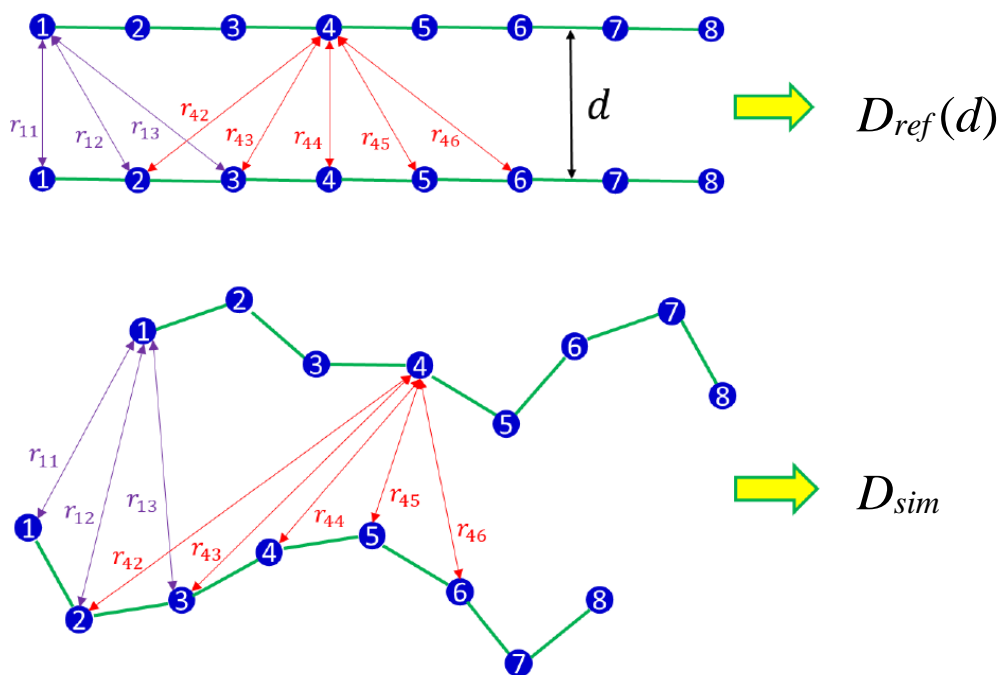


Obr. 8 – Definice dihedrálních úhlů na glykosidických vazbách [120]

Nejdůležitějším z dodatečných programů byl výpočet střední vzdálenosti řetězců D_{MD} . Ta byla definována jako vzdálenost dvou referenčních řetězců, vykazující stejnou elektrostatickou energii, následujícím způsobem:

³ Jak Wbr tak Ibr byly definovány geometricky – vodní mosty na základě vodíkových vazeb, které je tvoří, iontové na základě vzdálenosti iontu od řetězců, která byla nastavená jako max. 3 Å, stejně jako u HB.

- Byly definovány rovné, rovnoběžné a nikde se nepřekrývající referenční řetězce (viz. Obr. 9). Jednotlivé atomy v nich byly umístěny v pravidelných intervalech.
 - V případě vzdálenosti mezi HA řetězci šlo o interval 5 Å (po vzoru glykosidických kyslíků).
 - U alifatických řetězců byl interval 1.285 Å (dle vzdáleností uhlíků na řetězci).



Obr. 9 – Ilustrace referenčních a skutečných řetězců, pro výpočet jejich střední vzdálenosti podle rovnice (3) a matematického postupu, popsáno v bodech 1–3. Modré body představují jednotlivé atomy, červené a fialové vzdálenosti r_{ij} představují rozdíl $r_i - r_j$. [92]

- Pro vzdálenosti referenčních řetězců v intervalu od 1 do 100 Å (s přírůstkem 1 Å) byla vypočítána série hodnot D_{ref} podle následujícího vzorce:

$$D_{ref}(d) = \sum_{i=1}^{N_1} \sum_{j=1}^{N_2} \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} \quad (3)$$

kde \mathbf{r}_i a \mathbf{r}_j jsou polohové vektory jednotlivých atomů prvního a druhého řetězce, N_1 a N_2 jsou jejich počty a d je vzdálenost referenčních řetězců.

Veličina D_{ref} odpovídá elektrostatickému potenciálu mezi řetězci podle Coulombova zákona, pokud by konstanty a náboje byly při výpočtu nastaveny

na hodnotu 1 (protože jsou stejné pro referenční i simulační výpočet a při porovnání tak jejich reálná hodnota není důležitá).

3. Ze skutečných simulací a skutečných vzdáleností atomů v řetězcích byla podle stejného vzorce spočítána hodnota D_{sim} . Po jejím porovnání s maticí vypočítaných hodnot $D_{\text{ref}}(d)$ byla interpolována odpovídající vzdálenost d .

Jelikož případné další vyhodnocované charakteristiky byly využity pouze u konkrétních typů systémů, je jejich popis uveden na příslušných místech v textu. V případě vyhodnocování průměru byly použity hodnoty z celé délky simulace (pokud není explicitně uvedeno jinak).

6. Výsledky

6.1 Systémy s nesubstituovanými řetězci

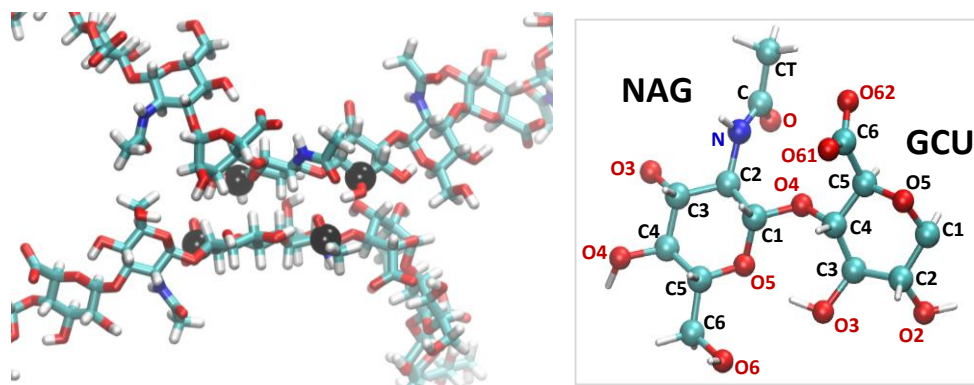
Nejprve byly prováděny analýzy řetězců nesubstituovaných (tato část výzkumu navazovala na výsledky bakalářské a diplomové práce). Za účelem analýzy jejich interakce byly simulovány dva dlouhé řetězce HA (složené z 48 sacharidových cyklů) ve vodném prostředí. Protože sledované charakteristiky bylo možné pozorovat i z kratších řetězců, další simulace už byly prováděny na řetězcích s 20 monosacharidovými zbytky. Krátké řetězce byly simulovány nejprve samostatně, opět v čisté vodě, ale také ve směsných rozpouštědlech voda:dioxan a voda:terc-butanol (při třech různých vzájemných objemových poměrech – 1:2, 1:1 a 2:1) a poté i jako dvojice ve snaze popsat jejich vzájemnou interakci.

6.1.1 Dynamika a interakce hyaluronanu ve vodném prostředí

Dlouhé řetězce byly simulovány ve vodném prostředí o čtyřech různých koncentracích NaCl (0M, 0.2M, 0.6M a 1M) a to za dvou různých teplot (275 K a 310 K). Byly vůči sobě orientovány antiparalelně. Protože u téměř všech systémů došlo poměrně rychle k jejich vzdálení, byla provedena další série výpočtů, kde byly řetězce udržovány ve vzájemné blízkosti fixací souřadnic čtyř atomů uhlíku (Obr. 10). Nefixované systémy byly simulovány 50–70 ns, fixované 80–100 ns. V boxu o velikosti cca $(150 \text{ \AA})^3$ se nacházelo asi 103 900 molekul vody, dva řetězce HA a příslušný počet sodných a chloridových iontů.

Výsledky simulací popisovaných v této podkapitole a kompletní rozbor interakcí mezi HA řetězci v čisté vodě je možné dohledat v článku „Salt-dependent

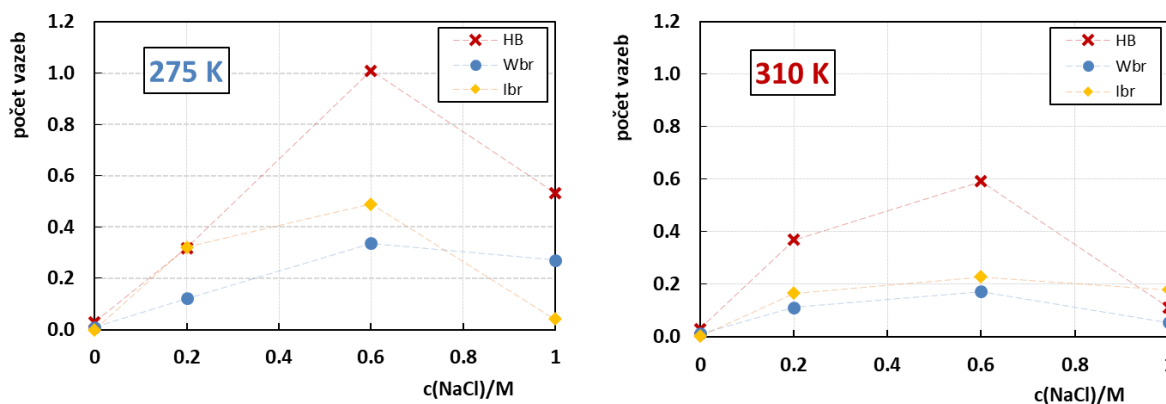
intermolecular interactions of hyaluronan molecules mediate the formation of temporary duplex structures“ [92].



Obr. 10 – Detail fixace pozice řetězců, kdy fixované atomy jsou zvětšeny a znázorněny černou barvou (vlevo). Přehled používaného značení atomů HA (vpravo) [92].

Interakcí mezi dvojicemi HA řetězců je ve vodném prostředí jen velmi málo, a i to až po přidání sodné soli. V 0M prostředí bylo sice přítomno 48 sodných iontů (odpovídající náboji dvou řetězců hyaluronátu), ale ty se rozptýlily po simulačním boxu. Celkový náboj v okolí HA tak zůstal záporný a řetězce se vzájemně elektrostaticky odpuzovaly.

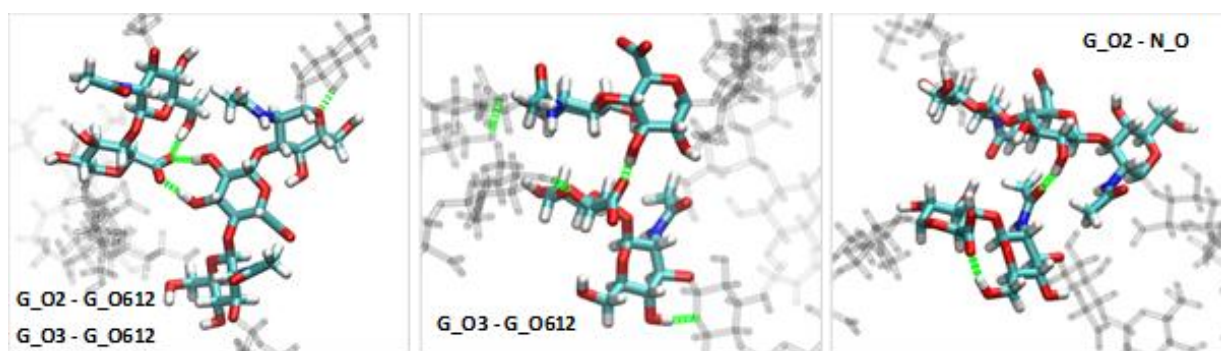
Za přítomnosti soli afinita řetězců mírně vzrostla, ale pořád byla velmi slabá. Pro její popis sloužilo měření nevazebných interakcí (s využitím softwarů NAMD a VMD), vyhodnocování počtu iontových a vodních mostů a také intermolekulárních vodíkových vazeb (Obr. 11). Místy sice mezi řetězci docházelo i k hydrofobní interakci, kdy se sacharidové cykly na obou řetězcích vzájemně orientovaly paralelně a z prostoru mezi nimi byla vypuzena voda, ale pokud v této pozici sacharidy nebyly zafixovány pomocí vodíkových můstků, interakce trvala jen velmi krátce.



Obr. 11 – Četnost vodíkových vazeb (červeně) a vodních (modře) a iontových (žlutě) mostů v různě koncentrovaných vodných roztocích NaCl za dvou různých teplot [92]

Jak je vidět z Obr. 11, ze tří výše jmenovaných typů vazeb byly nejčetnější vodíkové můstky. Závislost míry interakce na množství sodné soli zde nebyla lineární. V okamžiku, kdy koncentrace Na^+ překročila určitou optimální mez (pravděpodobně blízkou hodnotě 0.6 M, ale pro přesnější určení by bylo nutné provést další simulace), řetězce se ionty zcela obklopily a jejich vzájemná afinita poklesla. Skupiny, které by se mohly podílet na vodíkových vazbách, byly v takovém případě již obsazeny ionty, a to u obou řetězců, takže nebyl prostor ani pro vodíkové, ani pro iontové mosty.

Pokud došlo k formaci HB, vznikaly zejména mezi dvěma GCU, konkrétně mezi karboxylovou skupinou a OH skupinami na opačné straně cyklu, tedy na uhlících G_C2 a G_C3 (viz Obr. 12). Zejména při nižší teplotě dominovaly také vazby mezi GCU a NAG, vedoucí na kyslík amidové skupiny na NAGu (tedy N_O) nebo na OH skupinu na uhlíku N_C6. Vodíkových můstků, které by se tvořily mezi dvěma NAG cykly, bylo pozorováno jen relativně malé množství.



Obr. 12 – Vizualizace nejčastějších typů vodíkových vazeb. Atomy jsou značeny v souladu s Obr. 10. [92]

I při vzájemné interakci si řetězce zachovávaly konformaci volných molekul – k výraznějším změnám velikostí dihedrálních úhlů docházelo jen na vazbě mezi uhlíkem C4 a kyslíkem O4 na GCU, označené 14_2 (viz Obr. 8 a Obr. 10). Míra těchto rotací odpovídala hodnotám, pozorovaným u samostatného HA řetězce. [120]

Vlivem přítomnosti sodných iontů, které na řetězci rozrušovaly stabilizující intramolekulární HB, se s rostoucí koncentrací soli stávaly HA řetězce více ohebnými. Maximální flexibilita pak byla pozorována v systému w_0.6M. [92]

Přestože ve vodném prostředí docházelo mezi HA řetězci za přítomnosti soli ke krátkodobým interakcím, jejich vliv byl poměrně slabý. Řetězce se sice držely v relativní blízkosti, ale nevznikla žádná stabilnější duplexní struktura, která by vydržela déle než několik desítek nanosekund.

6.1.2 Prostředí směsných rozpouštědel

Pro ověření, zda je TIP3P dobrý model vody pro simulaci směsných rozpouštědel, nebo by bylo lepší využít SPC/E, byla provedena analýza⁴ distribuce vody a 1,4-dioxanu při nejrozličnějších látkových poměrech těchto dvou složek. Míra výsledné heterogenity směsi byla popsána pomocí Kirkwood-Buffových integrálů (KBI), matematického nástroje, využívaného k popisu homogenity směsi a míry její fázové separace.

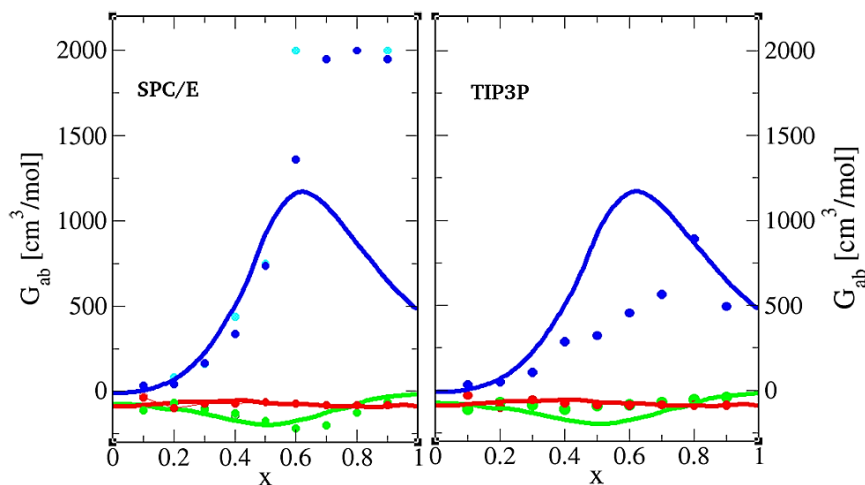
KBI jsou definovány jako součty všech korelačních funkcí $g(r)$ mezi konkrétními typy atomů směřovaných molekul (zde mezi kyslíky). Tyto integrály vyjadřují, jak jsou molekuly rozmístěny kolem sebe ve směsi, tedy jak pravděpodobné je najít jednu molekulu v určité vzdálenosti od jiné molekuly, čímž popisují prostorové uspořádání a interakce mezi nimi. Kvůli omezené velikosti simulovaného systému dochází k artefaktům, protože distribuční funkce $g(r)$ nemusí správně konvergovat k hodnotě 1 na velkých vzdálenostech, což by vedlo k divergenci KBI. Proto bylo nutné zavést korekci, která na základě dat získaných ze simulací upravuje tyto distribuční funkce tak, aby správně reflektovaly asymptotické chování systému a zajistila spolehlivé vyčíslení KBI.

Distribuční funkce byly s její pomocí mírně posunuty tak, aby i přes malý simulační systém konvergovaly k jedničce, čímž byla minimalizována možnost chyb, způsobených případnou divergencí. Pro řádnou analýzu fázové separace pak bylo nutné simulovat co největší boxy (korekce dobře fungovaly pro 16 384 molekul) a to alespoň po dobu 20 ns.

Výsledky simulací popisovaných v této podkapitole, další informace a podrobnější popis matematického pozadí lze dohledat v článku „Concentration fluctuation microheterogeneity duality illustrated with aqueous 1,4-dioxane“ [182].

Z přehledu KBI (G_{ij}) mezi vodou a dioxanem o různých vzájemných poměrech (Obr. 13) je vidět, že zatímco míra přitahování mezi molekulami vody a dioxanu nebo mezi dvojicemi molekul dioxanu (resp. mezi jejich kyslíky) je poměrně malá, afinita molekul vody (znázorněná modrou barvou) je značná. Z grafu také plyne, že zatímco u SPC/E jsou vypočítané hodnoty blízké těm experimentálním spíše při vyšším molárním poměru vody, u TIP3P je nejlepší shodu možné najít až za vysokých koncentrací dioxanu.

⁴ Tato část výzkumu byla provedena v rámci zahraničního výjezdu ve spolupráci s LPTMC, Sorbonne University. Výpočty byly prováděny na místní počítačové síti v programu GROMACS [185], který je hojně využívaný pro svou rychlost (i na méně výkonných počítačích) a podporu mnoha různých silových polí.



Obr. 13 – Vypočítané KBI pro směs vody a dioxanu (znázorněno body), ve srovnání s experimentálními výsledky (znázorněny plnou čarou), kde x představuje molární zlomek dioxanu. KBI pro interakci vody s vodou (G_{vv}) je znázorněno modře, interakce vody a dioxanu (G_{vd}) zeleně a interakce dioxanu s dioxanem (G_{dd}) červeně. Tyrkysová barva naznačuje výsledky G_{vv} bez korekcí. [182]

Zatímco SPC/E model lépe popisuje vodíkové vazby a vodní agregáty, při nízkém obsahu vody není schopen distribuci popsat správně. V tomto ohledu vycházely lépe simulace TIP3P. Ani jeden z modelů tedy není univerzálně lepší, ale výběr záleží na konkrétním systému. V případě simulací větších molekul v prostředí směšného rozpouštědla je pak slabší interakce mezi molekulami TIP3P spíše výhodou.

Stejně srovnání bylo provedeno i pro směsi vody a terc-butanolu. Z důvodů velké separace rozpouštědla nebylo ani při 16 384 molekulách možné provést adekvátní korekce divergence a výsledky tak nebyly nikde publikovány. Z předběžných dat však bylo vidět, že při simulacích s terc-butanolem vychází lépe vodní model TIP3P.

6.1.3 Dynamika hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech

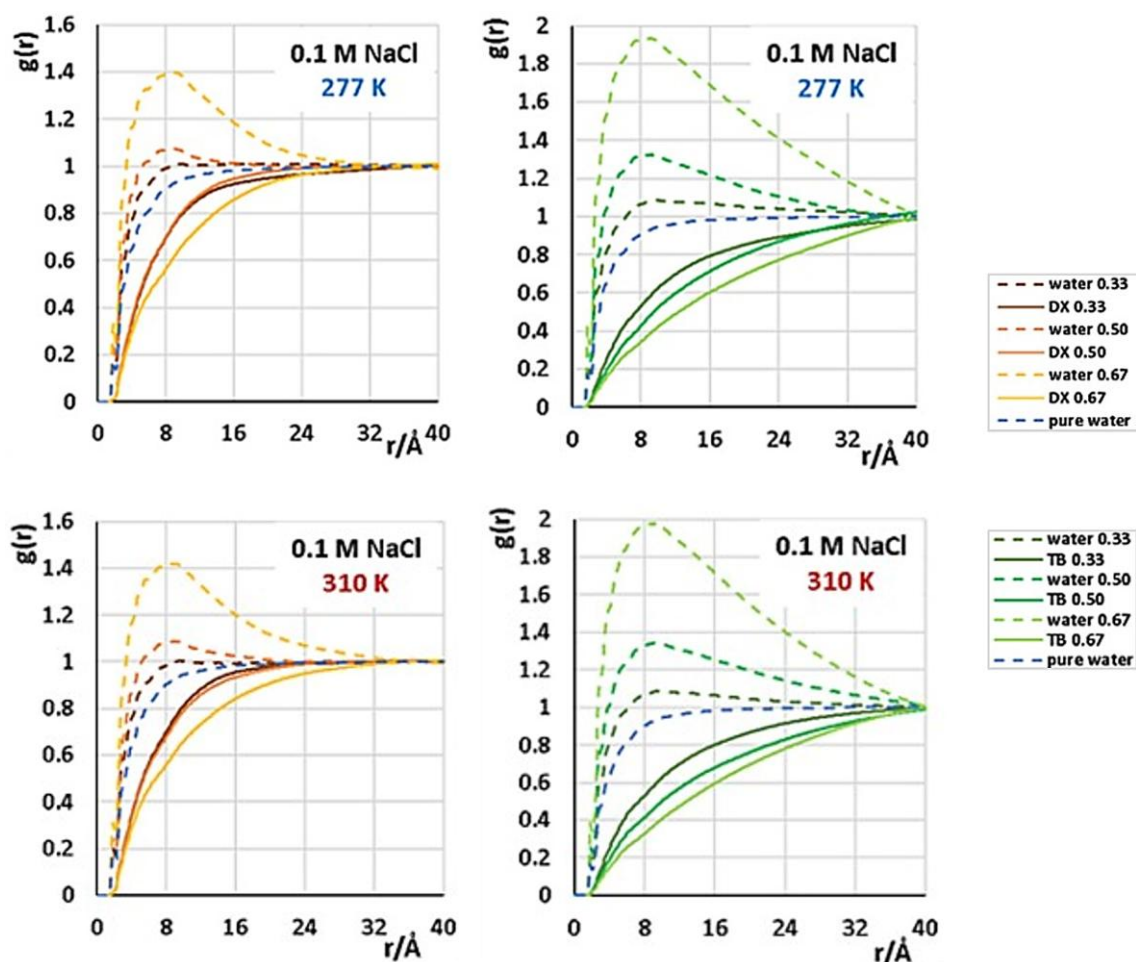
Krátký řetězec HA (20 sacharidů) byl simulován v čisté vodě a ve směsných rozpouštědlech vody s 1,4-dioxanem (DX) a s terc-butanolem (TB) o třech různých vzájemných objemových poměrech (2:1, 1:1 a 1:2). Koncentrace soli byla zvolena 0 M a 0.1 M a všechny simulace byly provedeny za dvou teplot⁵ – 277 K a 310 K po dobu nejméně 200 ns. V každém simulačním boxu o velikosti $(100 \text{ \AA})^3$ se kromě HA

⁵ Teplota 277 K byla stanovena jako nejnižší možná s ohledem na směsná rozpouštědla.

řetězce a iontů nacházelo řádově 10 000–20 000 molekul vody a 2 000– 4 000 molekul organického rozpouštědla.

Výsledky simulací popisovaných v této podkapitole a podrobný rozbor dynamiky HA řetězce ve směsných rozpouštědlech o různých koncentracích je možné dohledat v článku „Structure and dynamics of the hyaluronan oligosaccharides and their solvation shell in water: organic mixed solvents“ [183].

Hlavním poznatkem této části výzkumu bylo, že chování HA řetězce je výrazně ovlivněno volbou rozpouštědla a mírou separace jeho složek. Z porovnání radiálních distribučních funkcí (RDF, v grafech standardně značená $g(r)$) molekul vody a organické složky v blízkosti řetězců (Obr. 14) je vidět, že v okolí záporně nabitého řetězce převažovaly molekuly vody. Ty zde díky své vysoké polaritě stabilizovaly nabitě boční skupiny a tvořily hlavní část solvátového obalu řetězců.



Obr. 14 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovanou čarou) a organických složek (plnou čarou) v okolí HA řetězce při 0.1M koncentraci soli. Vzájemné poměry vody a organické složky jsou zde vyjádřeny jejím objemovým zlomkem. [183]

Mezi HA a okolní vodou také vznikalo velké množství vodíkových vazeb. Pozorovány byly i HB na organické molekuly, těch však bylo (vlivem jejich malého množství v bezprostředním okolí HA) jen velmi málo.

Fázová separace mezi vodou a organickými molekulami byla ovlivněna:

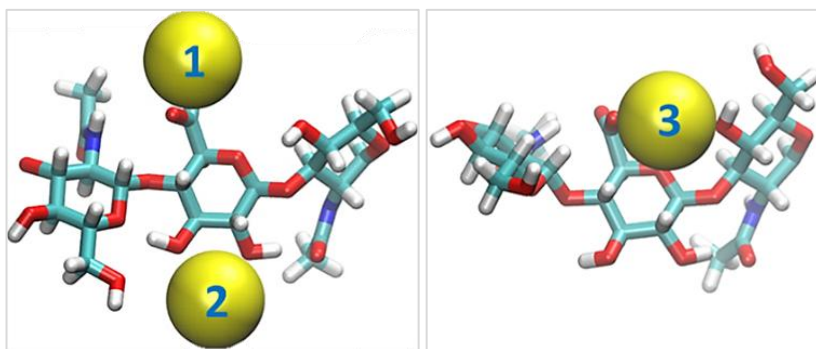
- a) typem rozpouštědla – ve směsích s terc-butanolem byla vlivem jeho permitivity a hydrofobního charakteru podstatně výraznější (viz Obr. 14)
- b) koncentrací soli – její přítomnost snižuje permitivitu a svou interakcí s vodou podporuje její separaci od zbytku rozpouštědla
- c) poměrem organické látky – čím víc organické složky rozpouštědlo obsahovalo, tím byla výsledná permitivita nižší a fázová separace výraznější

Kromě preference vody v bezprostřední blízkosti HA řetězce docházelo k separaci i v celém objemu simulačního boxu. Různé části řetězce tak procházely mikrofázemi o různém složení. Efekt byl podstatně výraznější v terc-butanolu, ale i v dioxanu docházelo k částečné separaci (viz 6.1.2 – Prostředí směsných rozpouštědel). Ta byla způsobena termodynamickými procesy, především rozdílnými chemickými potenciály⁶ jednotlivých složek rozpouštědla.

Dynamika systému byla ovlivněna také entropickými a entalpickými efekty. S nárůstem teploty docházelo k narušení/rozpadu solvatačního obalu, díky čemuž rostla i míra interakce HA s ionty (tzv. entropická stabilizace). Snižováním permitivity bylo oslabeno elektrostatické stínění HA řetězce a Na⁺ ionty byly silněji (entalpicky) přitahovány do jeho blízkosti. S nižší permitivitou však rostla i stabilita solvatačního obalu. Oba jevy se tak vyvažovaly a ve výsledku byly interakce Na⁺ a HA řetězců téměř nezávislé na teplotě (zejména při vyšším podílu organické složky).

Přítomnosti iontů v okolí řetězců zvyšovala jejich flexibilitu a to zejména ve směsi voda:dioxan. Ionty byly díky výše jmenovaným efektům velmi silně a ve velkém množství přitahovány ke konkrétním místům HA řetězce, viz Obr. 15. Tam pak narušovaly zpevňující intramolekulární vodíkové můstky (zejména při navázání na pozici č. 3 mezi karboxylovou skupinu a kyslík N_O4), čímž mimo jiné umožňovaly rotace kolem glykosidických vazeb mezi sacharidovými cykly.

⁶ Chemické potenciály je možné rozdělit na součet jejich dvou složek – ideální (po vzoru ideálního roztoku, závisící na koncentraci látky) a dodatkový (ovlivněnou vzájemnými mezimolekulárními interakcemi a vyjádřenou aktivitním koeficientem). Hodnoty tohoto potenciálu byly vyhodnoceny jak ze simulačních dat, tak z literatury. Skutečnost, že získané výsledky odpovídaly datům z experimentálních měření, potvrdila, že silové pole bylo zvoleno a nastaveno správně a simulované prostředí odpovídalo skutečnosti.



Obr. 15 – Místa nejčastějšího navázání iontů [183]

Přetáčení vazeb, které zvýšená přítomnost iontů umožňovala, bylo opět detekováno pomocí změn hodnot dihedrálních úhlů. Na rozdíl od čisté vody bylo ve směsných rozpouštědlech méně rotací vazby 14_2 a mnohem častěji se přetáčela vazba 13_1 (viz Obr. 8).

6.1.4 Interakce hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech

Pro simulace interakcí dvou kratších HA řetězců ve směsných rozpouštědlech (opět voda:dioxan a voda:terc-butanol) byly zvoleny koncentrace soli 0 M a 0.08 M. Poměr vody a organické složky byl v obou směsných rozpouštědlech 1:1 a i teplota byla tentokrát pouze jedna a to standardní (298.15 K). Tak se simulace co nejvíce přiblížily podmínkám, za kterých probíhá esterifikace HA, vedoucí k řetězcům substituovaným alifatickými řetězci, o nichž pojednává zbytek této práce.

Řetězce byly vzájemně orientovány antiparalelně i paralelně (v textu značeno prefixy ‚a_‘ a ‚p_‘). Tím, že u paralelně orientovaných řetězců došlo téměř ve všech prostředích k separaci či přímo přetočení do antiparalelní pozice, byla potvrzena hypotéza z předchozích výzkumů [92], že antiparalelní orientace je opravdu preferovanou konformací při případné interakci řetězců, a to nejen v čisté vodě.

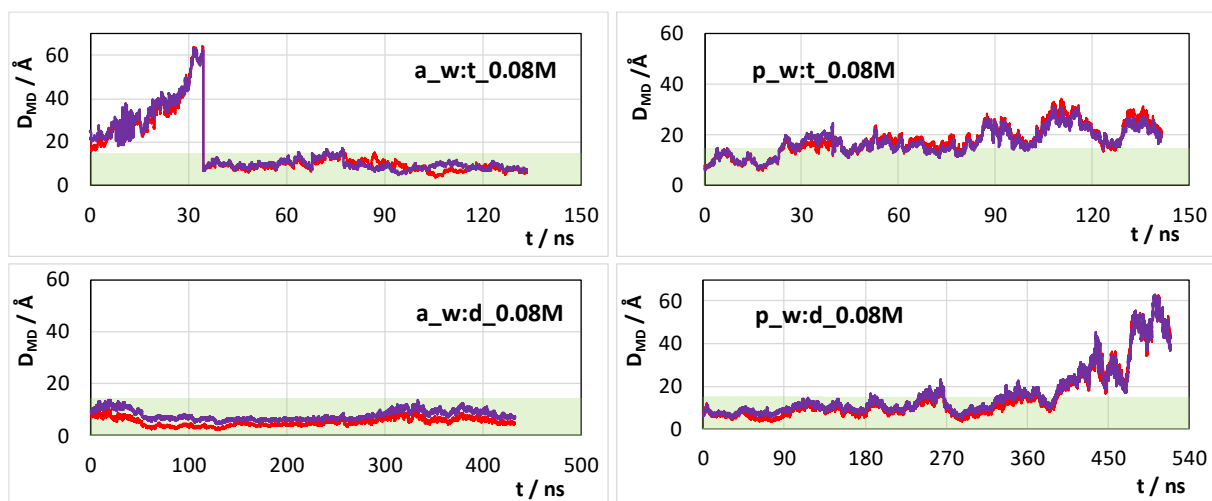
Na rozdíl od simulací v čisté vodě nebyly nijak fixovány, ale v případě separace byly opět manuálně přiblíženy k sobě⁷. Tak byl i přes případnou separaci řetězců omezen vliv náhody. Pro každý systém bylo napočítáno přes 70 ns (u řetězců s nízkou tendencí k separaci výpočet pokračoval ještě dál, mnohdy i přes 200 ns a u systémů, kde došlo k formaci duplexu i 500 ns). Simulační box měl velikost cca (115 Å)³ a nacházely se v něm: dva řetězce HA, až 280 iontů, 20 000–30 000 molekul vody a 4 000–6 000 molekul organického rozpouštědla (záleželo na koncentraci soli a typu rozpouštědla w:d / w:t).

⁷ Přiblížení bylo provedeno v programu VMD a to tak, aby se řetězce dostaly do podobné blízkosti, jako na počátku. Vlivem změny jejich konformací v průběhu simulací nebyla tato vzdálenost vždy stejná. Vždy ale umožňovala řetězcům zahájit vzájemnou interakci.

Výsledky simulací popisovaných v této podkapitole, podrobný rozbor interakcí mezi HA řetězci ve směsných rozpouštědlech a popis vzniklých dvoušroubovic lze najít v článku „Hyaluronan oligosaccharides form double-helical duplexes in aqueous solutions and mixed solvents“ [184].

Jak už naznačil předchozí výzkum, míra afinity řetězců se mezi jednotlivými rozpouštědly značně lišila. V 0M směsích (bez ohledu na to, zda se jednalo o čistou vodu, nebo vodu s dioxanem či terc-butanolem) nedocházelo k žádné interakci. Ani po opakovaném přiblížení řetězců se zde nevytvořila žádná duplexní struktura, což podporuje předchozí pozorování, že minimálně pro iniciaci interakce HA řetězců je třeba přítomnost soli.

Za přítomnosti NaCl došlo ve směsi vody a terc-butanolu došlo (v porovnání s vodou) k významnému nárůstu interakce. U antiparalelních řetězců se (po jednom rozplavání a přiblížení) střední vzdálenost D_{MD} pohybovala⁸ mezi 10 a 15 Å (Obr. 16), tedy pro vzájemnou interakci zcela ideálně. Paralelní řetězce se také zdržovaly relativně blízko u sebe, ale tvořilo se mezi nimi jen malé množství vazeb (HB, Ibr, Wbr). Vše navíc bylo ovlivněno mikrodoménovou strukturou rozpouštědla. Proto bylo při analýze nutné všechny charakteristiky průměrovat přes dostatečně dlouhé simulační časy (ideálně přes celý průběh simulace).

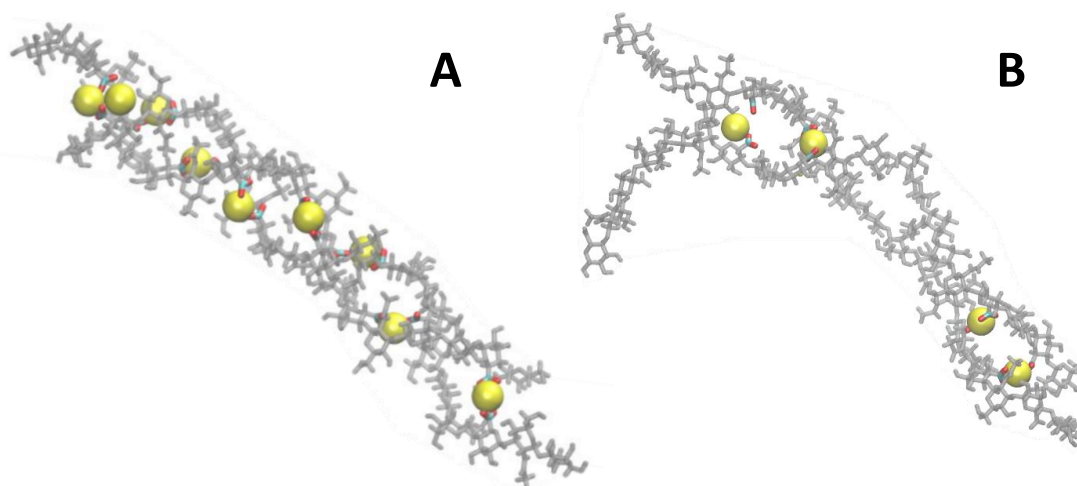


Obr. 16 – Přehled časového vývoje D_{MD} glykosidických kyslíků (fialově) a karboxylových skupin (červeně) mezi HA řetězci ve směsných rozpouštědlech (za přítomnosti NaCl). Zelenou barvou je znázorněna oblast, ve které může docházet ke stabilní interakci.

⁸ V důsledku opakovaného přiblížování řetězců nebylo možné porovnávat jejich průměrnou střední vzdálenost, tak jako u fixovaných systémů. (Ta zde totiž mimo jiné závisela na množství manuálních zásahů a na jejich provedení.) Proto byla míra interakce posuzována spíše z časového průběhu D_{MD} .

Výrazně nejvyšší míru vzájemné interakce mezi HA řetězci vykazovaly systémy w:d_0.08M. Vlivem iontů v blízkosti byl záporný náboj řetězců téměř kompletně neutralizován a ty se tak neodpuzovaly. Narušení intramolekulárních vazeb pak dávalo bočním skupinám více příležitostí pro tvorbu vazeb intermolekulárních.

Při 0.08M koncentraci NaCl byla dokonce v dioxanových směsích pozorována samovolná formace **dvoušroubovice**, a to při obou orientacích. Její stabilitu zajišťovaly zejména iontové mosty mezi karboxylovými skupinami, orientovanými směrem dovnitř do dutiny mezi řetězci (Obr. 17, pro srovnání s literaturou viz Obr. 3). Orientaci karboxylových skupin ilustruje i průběh grafů w:d směsí na Obr. 16, kde byla D_{MD} mezi nimi téměř po celou dobu simulace menší, než D_{MD} glykosidických kyslíků (a to opět u obou vzájemných orientací). V dutině šroubovice se pak kromě iontů nacházela pouze voda – pro organická rozpouštědla byl prostor příliš malý a jeho permitivita byla (i díky přítomnosti sodných iontů) příliš vysoká.



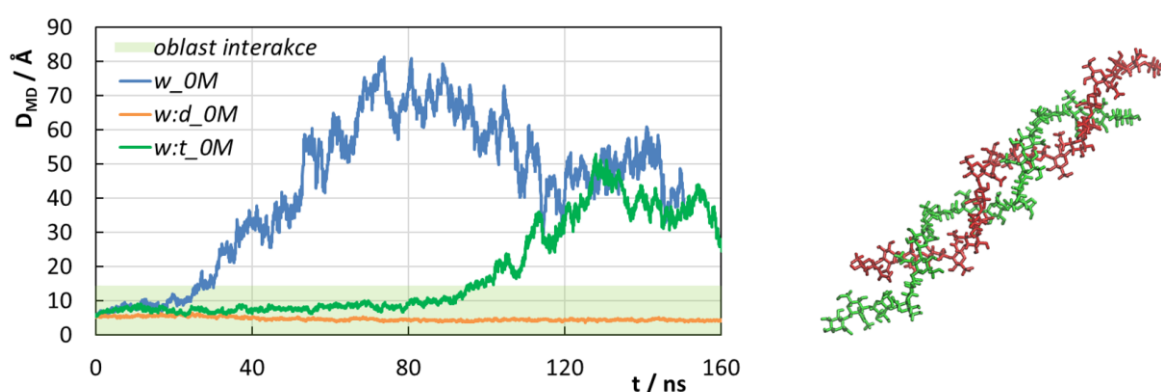
Obr. 17 – Antiparalelní (A) a paralelní (B) dvoušroubovice HA, zformované ve směsi w:d_0.08M, se zvýrazněnými iontovými mosty mezi karboxylovými skupinami. [184]

Duplexní tvar si HA řetězce udržely po dobu několik stovek nanosekund (antiparalelní 430 ns, paralelní 340 ns) a struktury byly přeneseny i do ostatních rozpouštědel⁹, a také do ještě vyšší koncentrace NaCl – 0.15 M (výrazný vliv přítomnosti soli vyvolal otázku, jaký vliv by mělo navýšení její koncentrace). V takovýchto nových systémech pak bylo porovnáváno, jak rychle došlo k rozpadu struktury a separaci řetězců.

⁹ Dvoušroubovice byla (za účelem zachování realističnosti) přenesena spolu s několika ionty v jejím nejbližším okolí. Definice této bezprostřední vzdálenosti byla testována na několika systémech, a nakonec byly zvoleny hodnoty do 1.5 Å pro antiparalelní systém (jelikož i takto blízko se v okolí řetězce nacházelo poměrně velké množství sodných iontů) a do 2.15 Å pro paralelní šroubovici.

U paralelní šroubovice, která nebyla ani počátku příliš pravidelná (jak je vidět z Obr. 17), došlo ve všech rozpouštědlech k separaci. Nejdéle si struktura udržela tvar v systému p_w:d_0.15M, ale i tam se po 100 ns rozpadla. Řetězce zde sice dál zůstaly v blízkosti, ale už ne v konformaci šroubovice. Podobně tomu bylo i ve směsích s terc-butanolem, kde ovšem k separaci došlo už při 50 (0M) a 80 (0.15M) ns.

Antiparalelní šroubovice byla stabilnější. Ve vodném prostředí se sice disociovala téměř stejně rychle, jako ta paralelní, ale ve směsi a_w:t_0.15M vydržela přes 160 ns. V systémech s dioxanem se šroubovice přesunem dokonce stabilizovala a stala se pravidelnější, a to prakticky bez ohledu na koncentraci soli – dokonce i při 0 M NaCl byla šroubovice v dioxanové směsi velmi pravidelná, viz Obr. 18. To naznačuje, že přestože by se v tomto prostředí šroubovice samovolně nezformovala, ještě neznamená, že se zde po vložení okamžitě destabilizuje.

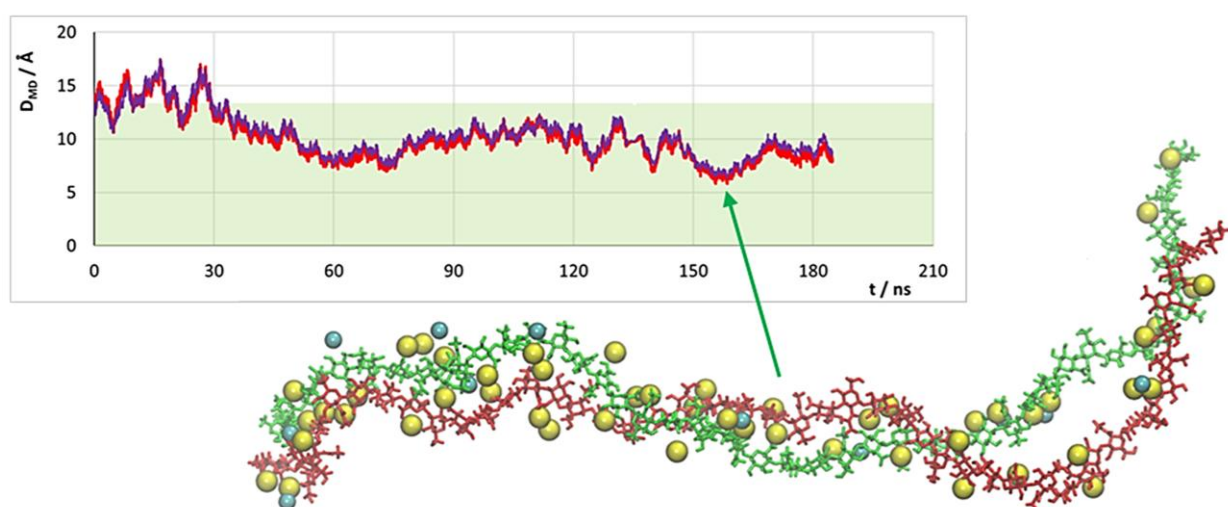


Obr. 18 – Střední vzdálenost řetězců D_{MD} po přenesení antiparalelní šroubovice do rozpouštědel s 0M koncentrací NaCl (vlevo). Dvoušroubovice vpravo je vizualizací systému a_w:d_0M (odpovídá tedy oranžové křivce v grafu).

Kromě iontových mostů se mezi řetězci tvořily i vodíkové vazby (zejména u méně pravidelných šroubovic). Skupiny, které se na HB podílely, byly velmi podobné, jako u řetězců v čisté vodě, i když zde bylo možné pozorovat trochu víc vazeb typu NAG–NAG. Důvod byl ten, že hydroxymethylová skupina na NAGu byla díky konformaci molekul orientována způsobem ideálním pro tvorbu vazeb (a naopak např. OH skupiny na GCU byly u šroubovic orientovány zcela mimo řetězec). Z tohoto důvodu byly i přes přítomnost iontových mostů poměrně časté i vodíkové vazby na karboxylovou skupinu.

Naopak u řetězců, které nezačínaly ze šroubovice a mohly se volně pohybovat po simulačním boxu, byly skupiny na G_C2 a G_C3 velmi frekventovaným místem k interakci, stejně jako karboxylová skupina nebo OH na N_C6 či N_C4.

Na základě výsledků experimentů se šroubovicemi byla v prostředí vody a dioxanu simulována i jedna antiparalelní dvojice dlouhých HA řetězců (48 sacharidů). U té sice nedošlo k formaci šroubovice, ale interakce mezi řetězci byla po celou dobu simulace velmi silná. Zprostředkovávaly ji iontové mosty a vodíkové vazby (stejného typu, jako u krátkých řetězců) a to tak pevně, že střední vzdálenost řetězců většinu simulace nepřekročila 13 Å (Obr. 19).



Obr. 19 – Graf časového vývoje D_{MD} glykosidických kyslíků (fialově) a karboxylových skupin (červeně) mezi dlouhými antiparalelními řetězci HA v $w:d_{0.1M}$ prostředí. Zelenou barvou je znázorněna oblast, kde nejčastěji dochází k interakci. Pod grafem je vizualizace systému v 160. ns simulace včetně iontů v jeho nejbližším okolí. [184]

Důvodem, proč v tomto systému nedošlo k formaci šroubovice, byla pravděpodobně relativně krátká doba simulace (napočítáno bylo jen 180 ns, což je pro tvorbu komplexnější struktury u dlouhých řetězců poměrně málo).

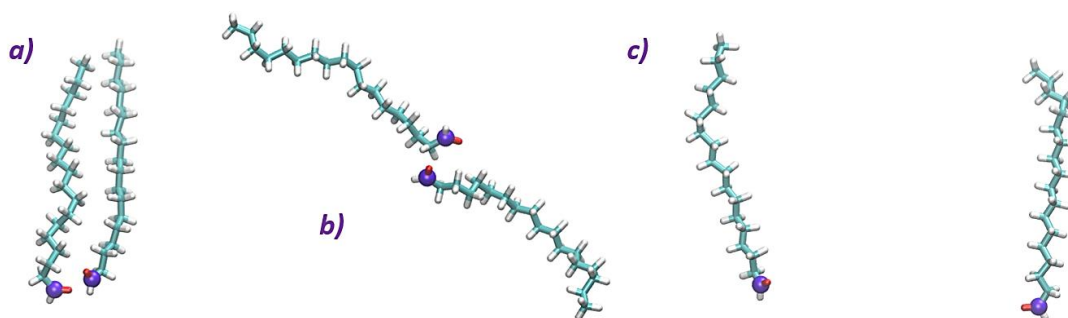
6.2 Simulace samostatných alifatických řetězců

V zájmu lepšího porozumění alifatickým substituentům byly tyto řetězce simulovány také samostatně. Jelikož při esterifikaci HA kyselinou stearovou zaniká její karboxylová skupina, byly v simulacích místo kyseliny stearové použity molekuly oktadekanalu.

Simulovány byly samostatné řetězce, ale i jejich dvojice s pevně zafixovanou polohou jednoho z konců (konkrétně prvního uhlíku, na kterém se nachází kyslík).

Počáteční umístění a vzájemná orientace dvojic řetězců byla v takovém případě stanovena následujícím způsobem (viz Obr. 20):

- a) Aldehydové skupiny zafixovány 4 Å od sebe, řetězce orientovány paralelně – simulace situací, kdy se vlivem ohebnosti řetězce substituenty velmi přiblížily.
- b) Aldehydové skupiny zafixovány 4 Å od sebe, řetězce orientovány opačným směrem – pro vyšetření, zda a za jak dlouho se k sobě přiblíží.
- c) Aldehydové skupiny zafixovány 23,55 Å od sebe – vzdálenost, přibližně odpovídající délce nataženého řetězce. U řetězců, umístěných tak daleko, na jejich vzájemné orientaci nezáleželo.



Obr. 20 – Počáteční orientace při simulaci aldehydových řetězců dle výše uvedeného rozdělení (fialovou barvou jsou znázorněny uhlíkové atomy s fixovanou polohou)

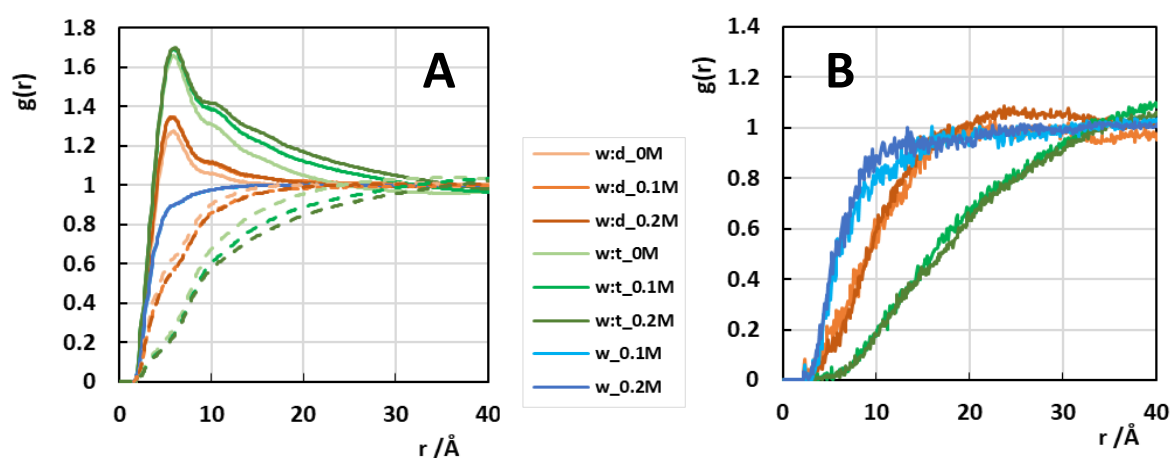
Každá z těchto variant byla simulována ve třech rozpouštědlech: čistá voda, směs voda:dioxan a směs voda:terc-butanol (v objemovém poměru 1:1). Do těch byl přidán chlorid sodný o třech různých koncentracích (0 M, 0.1 M a 0.2 M). Délka simulací byla přes 200 ns pro každý systém. Velikost hrany (přibližně krychlového) boxu se pohybovala mezi 90 a 95 Å a kromě řetězců a iontů se zde nacházelo přibližně 2 000 molekul organického rozpouštědla na 11 000 molekul vody.

Vzhledem k malým rozdílům mezi jednotlivými rozpouštědly byly simulace alifatických řetězců provedeny i za nižší teploty 277 K. Premisa, že pozorované charakteristiky mohou být významně ovlivňovány tepelným pohybem molekul, a tudíž by za nižší teploty mohly být případné trendy lépe vidět, se nepotvrdila. Přestože při 277 K byly některé výsledky mírně odlišné, nejednalo se o statisticky významný rozdíl. Proto jsou v této práci uvedeny pouze výsledky vypočítané při teplotě 298.15 K.

6.2.1 Složení směsi v blízkosti alifatických řetězců

Mezi organickými molekulami a alifatickými řetězci docházelo k hydrofobní interakci. Tím byla z jejich bezprostřední blízkosti vytlačována voda a výrazně tak narůstala tendence k fázové separaci směsných rozpouštědel.

Rozložení molekul v okolí samostatného alifatického řetězce ilustruje graf RDF na Obr. 21. Je vidět, že největší separace proběhla ve směsích s terc-butanolem, kde byl efekt hydrofobního vytlačení vody podpořen už tak výraznou tvorbou mikrofází směsného rozpouštědla. Mikrofáze se zde orientovaly tak, aby se v okolí alifatických řetězců (až do 30 Å) nacházely právě ty s převahou terc-butanolu. Porovnání četnosti pak ukázalo, že v bezprostřední blízkosti řetězců (do 4 Å od molekuly) bylo atomů terc-butanolu až 6.5násobně více než vody. Tento poměr vykazoval závislost na koncentraci soli – v 0M systému bylo terc-butanolu jen asi 6krát více, v systému w:t_0.1M 6.8krát, ale při 0.2M koncentraci soli už byl terc-butanol zastoupen téměř 8krát víc¹⁰.



Obr. 21 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára v grafu A), organické složky (plná čára v grafu A) a sodných iontů (plná čára v grafu B) v okolí samostatného alifatického řetězce

I ve směsi voda:dioxan bylo možné pozorovat preferenci organické složky (Obr. 21A). Efekt byl menší, než u přirozeně se separujícího terc-butanolu, ale i přes to se u řetězců nacházelo dvojnásobně více atomů dioxanu než vody (resp. ve směsi w:d_0M bylo dioxanu 1.9krát víc, v w:d_0.1M 2.1krát víc a až 2.2krát více bylo dioxanu při 0.2M koncentraci soli). Průběh RDF pro jednotlivé koncentrace byl v dioxanu dost podobný – viditelnější rozdíl byl pouze mezi křivkami 0M systému a systému s nenulovou koncentrací NaCl.

V grafu na Obr. 21B jsou pak ukázány kompletní RDF sodných iontů v okolí. Vzhledem k elektroneutralitě alifatických řetězců se distribuce téměř neliší bez ohledu na to, kolik soli bylo do systému přidáno. Je však patrné, že přítomné ionty

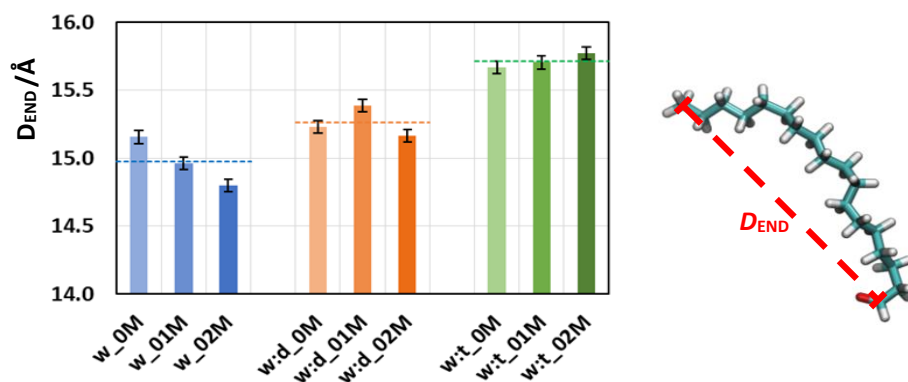
¹⁰ Kompletní přehled četnosti atomů rozpouštědla ve vzdálenosti do 4 Å od řetězců (včetně srovnání s alifatickými řetězci naroubovanými na HA páteři) je k vidění v Tab. 2 v kapitole 6.3 – Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci.

preferovaly prostředí vody. V okamžiku fázové separace do mikrodomén se tak většina z nich soustředila do oblastí bohatších na vodu. V organických mikrodoménách (a tedy i v bezprostřední blízkosti alifatických řetězců) proto bylo množství iontů minimální, jak ukazují zejména křivky systémů voda:terc-butanol.

RDF dvojic řetězců zde uvedeny nejsou, protože v jejich okolí se rozpouštědlo separovalo prakticky totožným způsobem. Výsledné grafy tak byly téměř identické jako ty na Obr. 21 s pouze drobnými rozdíly, způsobenými narušením solvátového obalu přítomností dalšího alifatického řetězce. V případě, kdy spolu oba řetězce interagovaly, a to zejména ve vodě (podrobnější rozbor v následující podkapitole), navíc docházelo k téměř úplnému vytlačení molekul rozpouštědla z prostoru mezi nimi či jejich nejbližšího okolí.

6.2.2 Ohebnost alifatických řetězců a jejich vzájemná interakce

Samostatný alifatický řetězec vykazoval k ohýbání jen mírnou tendenci – vzdálenost jeho konců (Obr. 22) se pohybovala kolem 15.5 Å. Což je přibližně 75 % délky v nataženém stavu (cca 21 Å). Řetězce byly částečně ohýbány hydrofobní interakcí mezi jejich různými částmi, ale proti ní působil tepelný pohyb, který tato interakce nedokázala překonat ani při nižší teplotě (proto taky byly výsledky simulací obou teplot téměř totožné).



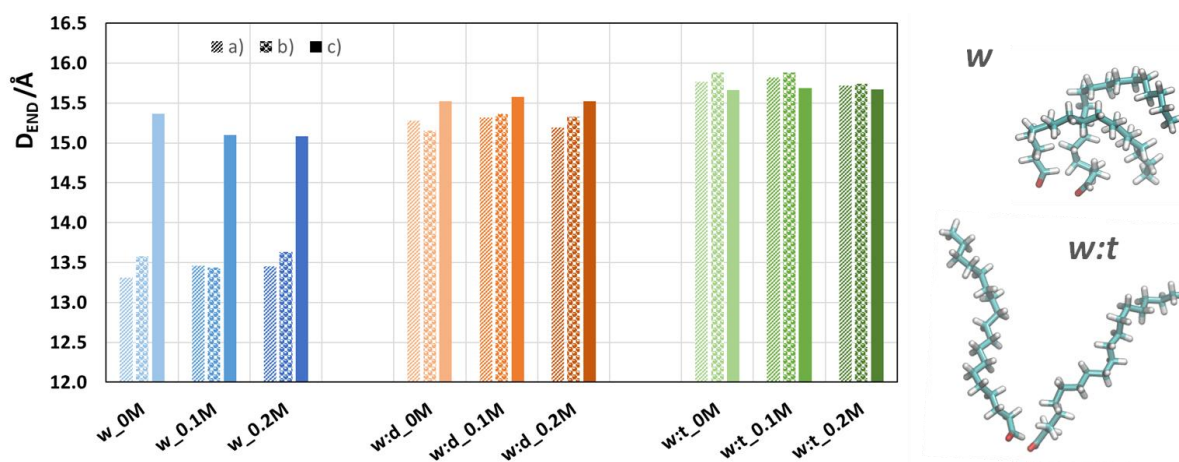
Obr. 22 – Vzdálenost konců alifatického řetězce v různých systémech (vlevo) s vizualizací, jak byla tato vzdálenost měřena (vpravo)

Mezi jednotlivými rozpouštědly se ohebnost příliš nelišila – rozdíl mezi nejmenší a největší vzdáleností konců řetězce byl pouze 1 Å. Přesto je na základě grafu na Obr. 22 možné vyslovit hypotézu, že nejvíce se řetězce ohýbaly ve vodě a nejméně v terc-butanolu. To také odpovídá pořadí, danému permitivitou – nejvyšší má voda, následuje směs vody a dioxanu a nejnižší permitivitu vykazuje téměř čistý terc-

butanol, vyskytující se v podobě mikrodomény v bezprostředním okolí alifatického řetězce.¹¹

V čisté vodě zvyšovala permitivitu přítomnost iontů. Důsledkem toho narůstala míra hydrofobní interakce podél řetězce a ty se více ohýbaly. Ve směsi s terc-butanolem ionty navyšovaly tendenci k fázové separaci, čímž ještě snižovaly permitivitu mikrodomén bohatých na terc-butanol a řetězce neměly k ohybu důvod. Jen ve směsích vody a dioxanu nevykazoval D_{END} na koncentraci soli žádnou pravidelnou závislost.

U systémů, kde byly simulovány dva alifatické řetězce, záležela ohebnost na jejich vzájemné poloze (Obr. 23). V případě, že od sebe byly dostatečně vzdálené (jako tomu bylo u systému ,c‘), neměly na sebe řetězce téměř žádný vliv a jejich ohebnost odpovídala hodnotám získaným ze simulací samostatných řetězců (tedy těm na Obr. 22).



Obr. 23 – Srovnání vzdálenosti konců dvojic alifatických řetězců (D_{END}), kdy pro každý systém se jedná o hodnotu vzdálenosti, zprůměrovanou z obou řetězců (vlevo). Vpravo: vizualizace stáčení dvojic řetězců v čisté vodě (w) a naopak jejich narovnání v terc-butanolové směsi (w:t)

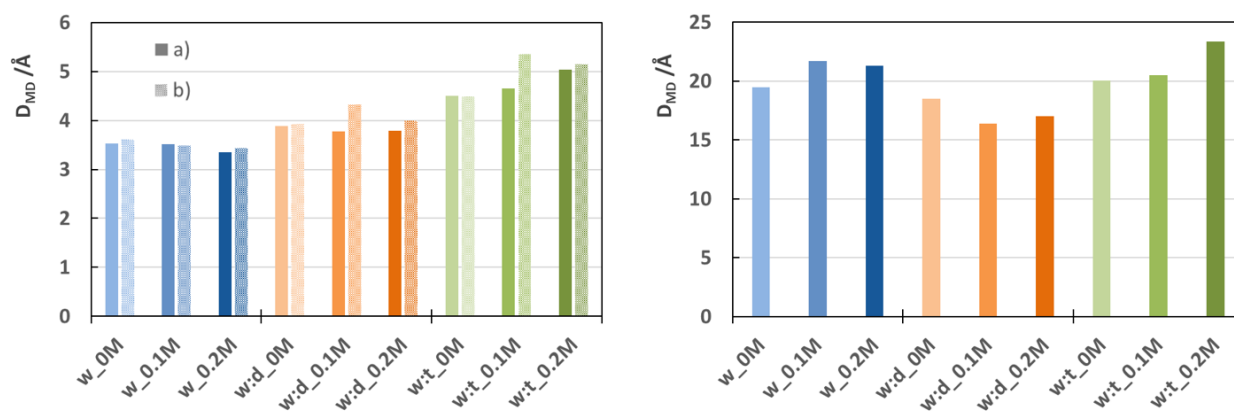
U řetězců fixovaných v bezprostřední blízkosti (tedy systémy ,a‘ a ,b‘) bylo působení hydrofobní interakce po celé jejich délce podstatně silnější. Zejména v čisté vodě se tyto řetězce zcela obtáčely kolem sebe (jak je vidět z vizualizace na Obr. 23) za účelem minimalizace rozhraní s vysoce polární vodou. To vedlo ke vzniku semistabilního aglomerátu, jehož podoba se v průběhu simulace dynamicky měnila

¹¹ Permitivita terc-butanolu je sice oproti čistému dioxanu vyšší, ale dioxan je zde smíchán s vodou, což u terc-butanolu díky separaci rozpouštědel tak docela neplatí.

– několikrát došlo k separaci, ale řetězce se vždy vrátily k sobě. Díky tomu byla i jejich vzájemná střední vzdálenost (D_{MD} na Obr. 24) ve všech systémech s vodou (modré sloupce) velmi nízká.

Ve směsi vody a dioxanu byla přítomností druhého řetězce hydrofobní interakce také posílena. Na rozdíl od systémů v čisté vodě však nebylo možné pozorovat významné rozdíly v jejich ohebnosti. Přestože graf na Obr. 23 naznačuje, že D_{END} je v systémech ,a‘ a ,b‘ vždy o něco nižší než u ,c‘, v absolutních hodnotách je rozdíl minimální (osa y na grafu nezačíná v nule).

I v terc-butanolových mikro-doménách docházelo k hydrofobní interakci, ale ne mezi alifatickými řetězci. V důsledku silné snahy řetězců obklopovat se molekulami terc-butanolu se chovaly prakticky stejně, jako by byly v systému každý sám (Obr. 23, w:t). Tento jev byl nejspíše také důvodem, proč byla střední vzdálenost mezi dvojicí alifatických řetězců nejvyšší právě ve směsi voda:terc-butanol.



Obr. 24 – Střední vzdálenost řetězců (D_{MD}) pro systémy a, b (vlevo) a c (vpravo)

Vzhledem k tomu, že se systémy ,a‘ a ,b‘ lišily pouze počáteční orientací řetězců a během několika prvních nanosekund se obvykle systém ,b‘ přetočil do orientace ,a‘, oba vykazovaly ve většině případů téměř totožné chování.

Při posuzování středních vzdáleností řetězců v systému ,c‘ už se trendy liší výrazněji. Tím, že byly řetězce umístěny relativně daleko od sebe, hrály roli hlavně dva faktory: Ohebnost řetězců (ve smyslu, jestli na sebe ,dosáhly‘) a dále síla hydrofobní interakce v případě, že se řetězce vlivem náhodného pohybu dostaly do vzájemné blízkosti.

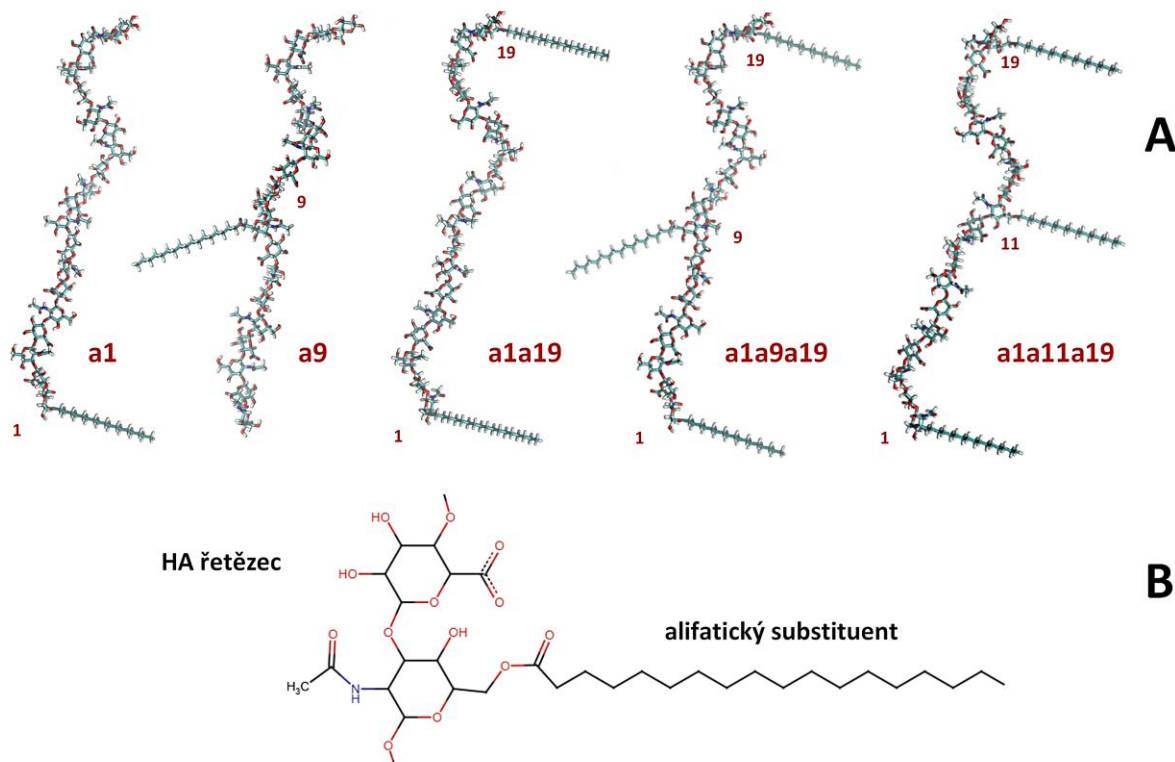
Pro uspořádání ,c‘ byly nejnižší hodnoty D_{MD} naměřeny ve směsích s dioxanem. Vzhledem k relativně nízké ohebnosti zde na sebe řetězce dobře dosáhly, a když na sebe v prostoru narazily, mírná hydrofobní interakce je dokázala na krátký čas udržet v blízkosti. Kombinace těchto faktorů pak vedla k nízkým hodnotám D_{MD} .

V čistě vodném prostředí se kolem sebe řetězce obtáčely ještě o něco více, což byl pravděpodobně důvod, proč na sebe tak dobře nedosáhly. Ve směsi s terc-butanolem pak řetězce (stejně jako v systémech ‚a‘ a ‚b‘) preferovaly zůstat ve volném prostoru, obklopeny molekulami organické složky. Jakékoliv případné snížení jejich relativní vzdálenosti pak bylo způsobeno náhodným přiblížením.

Z grafů na Obr. 24 je dále vidět, že přestože přítomnost soli hraje ve vzájemné interakci řetězců roli, není možné její vliv generalizovat. V terc-butanolových směsích, kde sůl podporuje separaci, jsou řetězce ještě více obklopeny terc-butanolem a jejich afinita ke vzájemné interakci se téměř zcela vytrácí. Na druhou stranu ve vodě a v dioxanu není s rostoucí koncentrací NaCl vidět žádný trend v D_{MD} .

6.3 Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci

Simulace substituovaného hyaluronátu sodného byly provedeny pro pět různých systémů, lišících se umístěním substituentů na HA páteři a jejich počtem (Obr. 25). Všechny takto upravené řetězce byly opět simulovány jak ve vodě, tak v obou směsných rozpouštědlech, za tří různých koncentrací NaCl – 0 M, 0.1 M a 0.2 M (vyšší koncentrace soli nebyla možná z důvodu rozpustnosti).

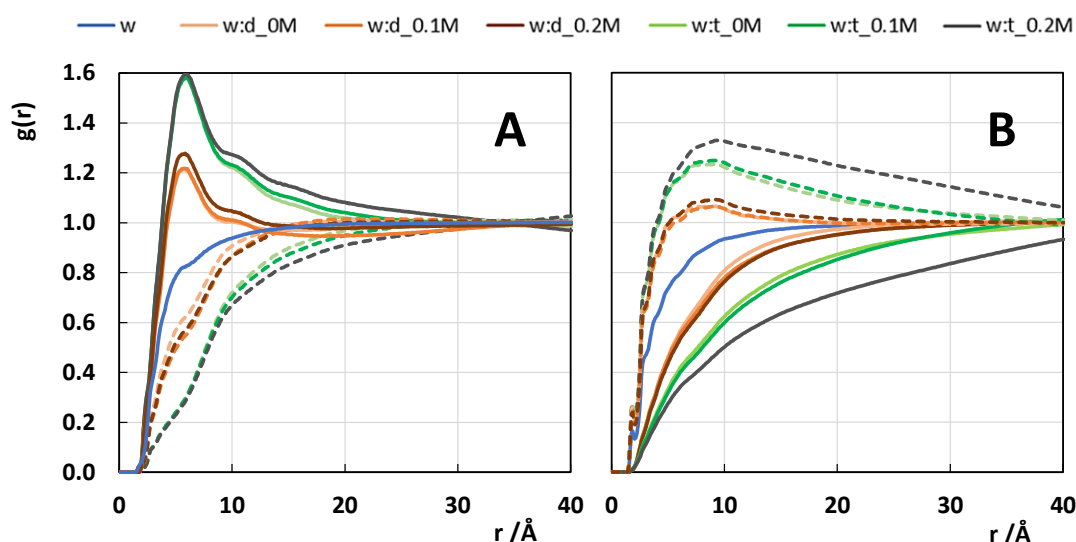


Obr. 25 – Varianty substituovaných systémů na počátku simulace, označených podle čísla sacharidového residua, na kterém jsou substituenty navázány (A) a detail navázání substituentu (B)

Pro každý systém bylo nasimulováno více než 250 ns, délka hrany boxu byla přibližně 107 Å a systém obsahoval 19 000–21 000 molekul vody na 3400–3900 molekul organické složky.

6.3.1 Distribuce rozpouštědla v okolí substituovaných řetězců

Stejně jako v případě samostatných alifatických řetězců, i zde se organická fáze shromažďovala v blízkosti substituentů. A naopak voda (i s ionty, které se v ní zdržovaly) byla přitahována k HA páteři. Při vykreslení RDF rozpouštědla pouze v okolí substituovaných řetězců (Obr. 26A) je patrné, že distribuce kolem substituentů má téměř totožný průběh jako distribuce rozpouštědla kolem samostatných alifatických řetězců (pro srovnání viz Obr. 21).¹²



Obr. 26 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára) a organické složky (plná čára) v okolí substituentů na řetězci a1a19 (A) a v okolí jeho HA páteře (B)

Naopak rozložení molekul kolem páteře (Obr. 26B) se velmi podobá RDF kolem nesubstituovaných řetězců (viz Obr. 14) [183]. V blízkosti HA výrazně převládá voda a organických molekul se zde nacházelo jen málo. Rozdíl v distribuci mezi páteří a substituenty byl zapříčiněn jejich hydrofobicitou, hydrofilitou HA páteře a s tím spojenou fázovou separací celého rozpouštědla, zdatelně podpořenou přítomností sodné soli. Tato separace už byla v minulosti pozorována a popsána [6]. Přestože v citovaném výzkumu byly použity kratší substituenty a pouze 0.1M koncentrace NaCl, průběh distribučních křivek byl téměř totožný jako na Obr. 26.

¹² Totéž bylo pozorováno i u ostatních substituovaných systémů, jejichž distribuční křivky zde nejsou uvedeny.

Převahu organických molekul v okolí substituentů opět ilustruje také přehled četností atomů jednotlivých složek rozpouštědla (Tab. 2) v bezprostřední blízkosti řetězců (do 4 Å). Pro srovnání jsou uvedeny i hodnoty odpovídající samostatným alifatickým řetězcům (sekce A), u kterých byl tento efekt výraznější, viz kapitola 6.2.1 – Složení směsi v blízkosti alifatických řetězců.

Tab. 2 – Průměrný podíl atomů organické a vodné složky rozpouštědla (d/w a t/w) v bezprostřední blízkosti samostatných alifatických řetězců (sekce A), v okolí substituentů na HA řetězcích (sekce B) a podíl vodné a organické složky (w/d a w/t) poblíž HA páteře (sekce C). Hodnoty jsou průměrovány mezi všemi systémy, v pravé části každé sekce pak také mezi všemi koncentracemi soli.

c(NaCl) / M		A		B			C	
0	d/w	1.9	2	1.5	1.6	w/d	2.6	2.6
0.1		2.1		1.6				
0.2		2.2		1.7				
0	t/w	6	6.5	4.0	4.3	w/t	4.0	4.2
0.1		6.8		4.3				
0.2		8		4.6				

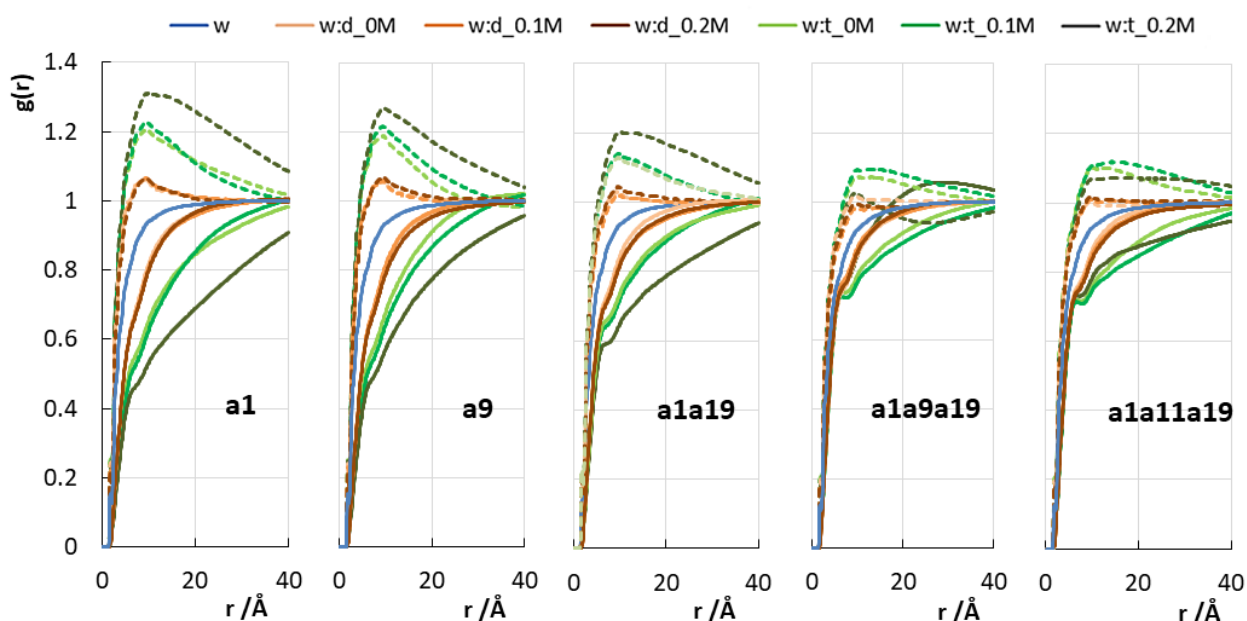
Substituenty naroubované na řetězec s ním totiž sdílí část nejbližšího okolí, což do statistiky znatelně zasahuje. Přesto je i zde vidět relativně mírná fázová separace ve směsích vody a dioxanu (jejich poměr je relativně nízký) a podstatně výraznější separace v případě vody a terc-butanolu.

Zajímavé je, že zatímco v okolí substituentů se nacházelo dvojnásobné množství atomů dioxanu oproti atomům vody (poměr d/w), v blízkosti HA páteře, kde naopak převládala voda, vycházel jejich převrácený poměr (w/d) 2.6. Toto číslo navíc v blízkosti HA páteře na rozdíl od ostatních systémů v tabulce zdánlivě nezáviselo na koncentraci soli.

Důvodem obou těchto skutečností by mohly být právě sodné ionty. Ty se zejména v dioxanových směsích významně zdržují u páteře a způsobují tu celou řadu efektů – mimo jiné pokles četnosti intramolekulárních vodíkových vazeb a s tím spojený nárůst ohebnosti řetězce. Je tak možné, že tyto ionty aktivně přitahují vodu do blízkosti HA páteře, díky čemuž poměr w/d významně narůstá, a to téměř bez ohledu na to, jaká byla původní koncentrace iontů v roztoku.

Při porovnání RDF vody a organické složky kolem jednotlivých substituovaných molekul (Obr. 27) je vidět, že v celkovém součtu převažuje v okolí řetězců voda.

Přestože se distribuce v okolí substituentů a páteře velmi liší, substituentů není dost na to, aby jejich přítomnost výrazněji ovlivnila celkové rozložení rozpouštědla kolem řetězce. S jejich přibývajícím množstvím je však vidět, jak se k sobě křivky vody a organické složky přibližují, zatímco distribuce systému „a1“ (kde je jen jeden substituent, a to zcela na okraji) je téměř totožná s distribucí řetězců nesubstituovaných (viz Obr. 14). Z grafů je dále patrné, že ve vodě ani v dioxanové směsi distribuce téměř nezávisí na koncentraci iontů. U RDF řetězců se třemi substituenty se tato závislost stírá i ve směsích s terc-butanolem.

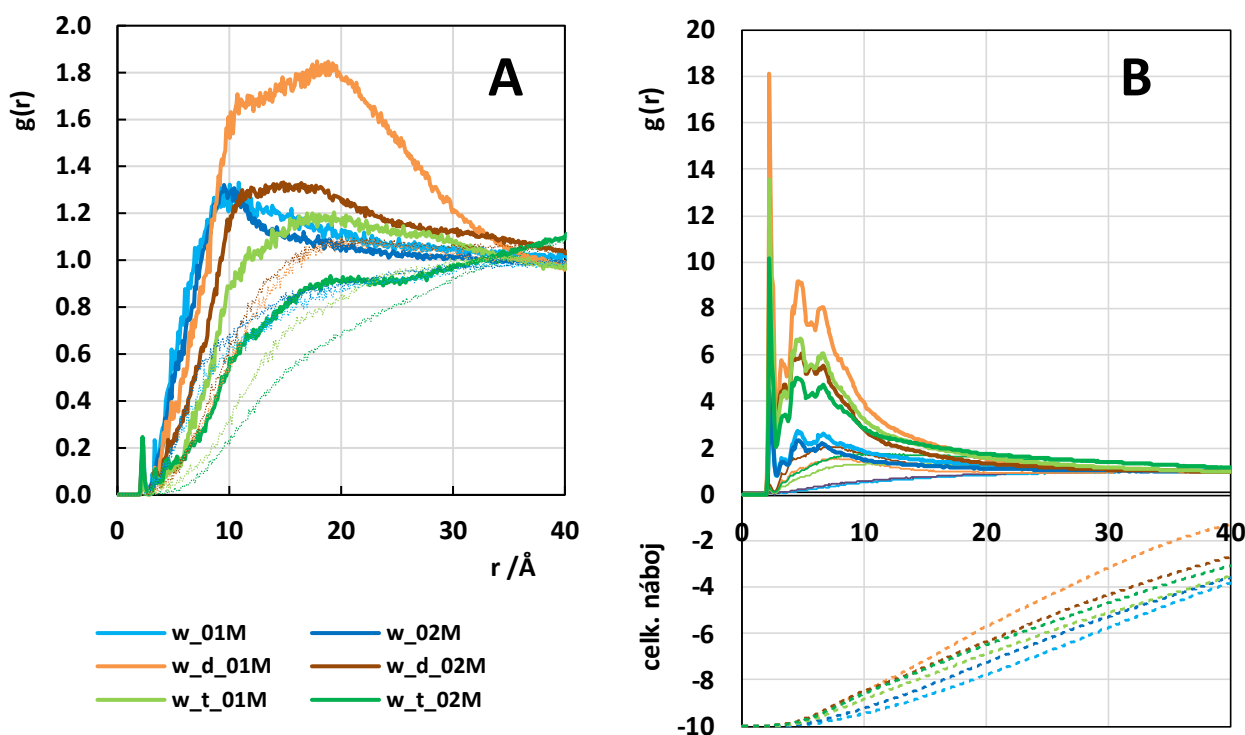


Obr. 27 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára) a organické složky (plná čára) v okolí celého řetězce pro všechny systémy substituované HA

6.3.2 Distribuce iontů v okolí substituovaných řetězců

Jak už bylo uvedeno v předchozích kapitolách, v případě mikrodoménové separace se ionty vyskytovaly převážně v oblastech bohatších na vodu. Radiální distribuční funkce sodných iontů v okolí substituovaných řetězců (Obr. 28) tak do značné míry kopírují právě průběh RDF pro molekuly vody.

Jednoznačně nejvíce iontů se v blízkosti řetězců nacházelo za přítomnosti dioxanu (konkrétně směsi w:d_0.1M). Jejich množství poblíž páteře (tedy na grafu B) je také důvodem výrazného píku ve vzdálenosti 15–25 Å na grafu A. Kromě tohoto výraznějšího maxima distribuce opět kopíruje průběh, předpokládaný na základě simulací samostatných alifatických řetězců (Obr. 21).



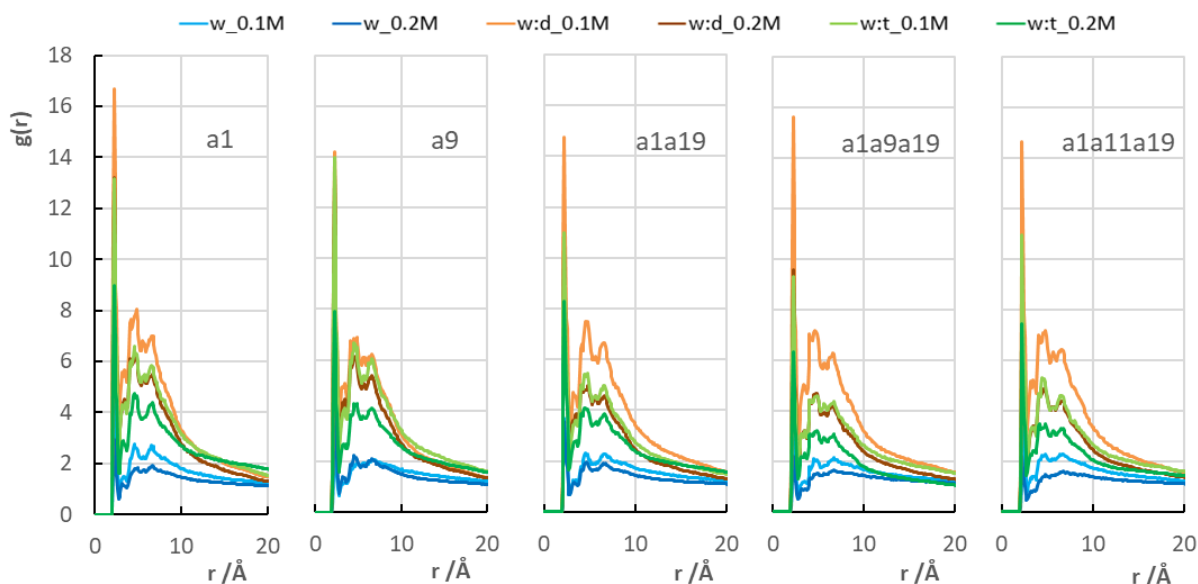
Obr. 28 – Radiální distribuční funkce sodných (tlustá čára) a chloridových (tenká čára) iontů v okolí substituentů na řetězci a1a19 (A) a v okolí jeho HA páteře (B) pro nenulové koncentrace soli¹³. Na grafu B je dále znázorněn i celkový náboj v dané vzdálenosti od páteře (přerušovaná čára).

Jak už bylo zmíněno výše, do blízkosti HA páteře byly ionty přitahovány hlavně elektrostaticky, a to zejména v 0.1M směsi s dioxanem. Zde byl přebytek iontů v blízkosti páteře oproti volnému solventu výrazně největší. Z podstatně mírnějšího průběhu křivek w:d_0.2M je možné usuzovat, že existuje jistá hraniční koncentrace, nad kterou už si ionty vzájemně překáží, dochází mezi nimi k odpuzování a jejich efekty se navzájem vyruší (podobně jako při 0.6M koncentraci u nesubstituovaných řetězců v čisté vodě [92]). Proto byl náboj v okolí HA nejvyšší právě u systému w:d_0.1M (Obr. 28B). Ani ve vzdálenosti 40 Å od řetězce však nedošlo k úplné kompenzaci záporného náboje HA páteře.

I v čisté vodě se v blízkosti substituentů vyskytovalo jen relativně málo iontů (ani vyšší koncentrace soli jejich distribuci téměř neovlivnila). Ve směsi voda:terc-butanol pak byly ionty ve vodních mikrodoménách (a tudíž v blízkosti páteře) a v okolí substituentů se téměř nevyskytovaly.

¹³ Na grafech nejsou uvedeny systémy s 0M koncentrací iontů, jelikož se v nich nacházelo jen deset sodných iontů (kompenzujících náboj hyaluronanu) a většina z nich se vyskytovala právě v blízkosti HA páteře.

Ze srovnání celkové distribuce sodných iontů kolem všech simulovaných systémů (Obr. 29) lze vidět, že stejně jako u distribuce vody a organické složky, i zde se grafy podobají RDF poblíž páteře. Při srovnání jednotlivých systémů mezi sebou se zdá, že ani počet, ani umístění substituentů na HA řetězcích nemá na distribuci iontů v jejich okolí téměř žádný vliv (a pokud ano, tak jen velmi malý).

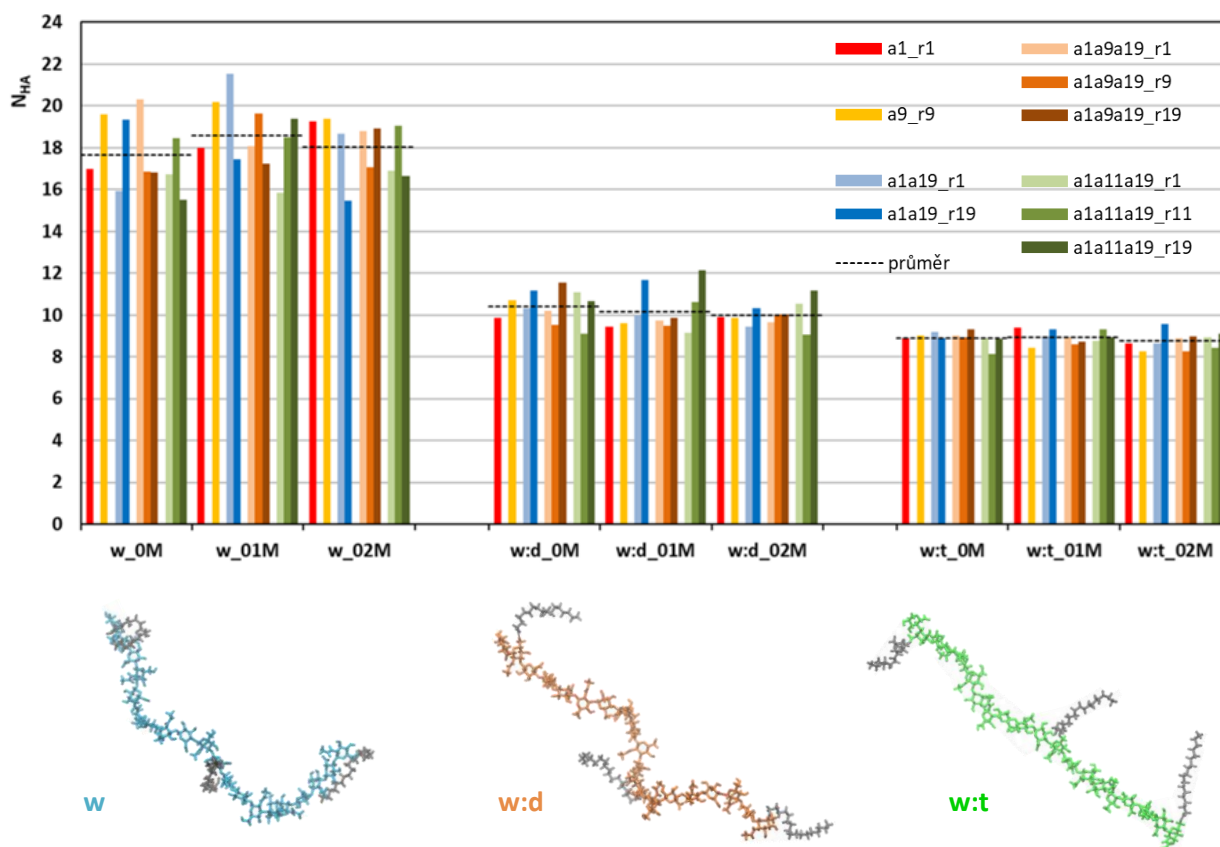


Obr. 29 – Radiální distribuční funkce sodných iontů v okolí celých řetězců (včetně substituentů)

6.3.3 Orientace substituentů v prostoru

Zda substituenty preferují zůstat v blízkosti HA řetězců, nebo dávají přednost interakci s rozpouštědlem, bylo vyšetřováno pomocí analýzy počtu atomů HA řetězce (N_{HA}) do 4 Å od alifatických zbytků. Jak je vidět z grafu na Obr. 30, ve směsích, obsahujících organickou složku substituenty preferovaly spíše interakci s molekulami rozpouštědla (konkrétně s molekulami organické složky). V blízkosti HA řetězce se tak nacházela jen malá část substituentu. Naopak ve vodě měly řetězce kvůli své hydrofobicitě tendenci zůstat spíše v blízkosti HA páteře – N_{HA} je tu oproti systémům s organickou složkou téměř dvojnásobný.

I mezi výsledky pro různá umístění substituentů byly drobné rozdíly, ale ty byly způsobeny právě jejich odlišnou pozicí. Například substituenty uprostřed, tedy r9 a r11 (značené podle pořadí residua, na němž se nacházejí), byly defaultně v blízkosti více atomů HA páteře, než substituenty na koncích řetězců).



Obr. 30 – Přehled počtu atomů HA v blízkosti jednotlivých substituentů (N_{HA}), označených dle monosacharidového residua, na kterém se nacházely, vč. průměru, znázorněného černě (nahore). Odchylky nejsou uvedeny, jelikož byly řádově menší než zobrazené hodnoty. Vizualizace systémů *a1a9a19* v různých prostředích (dole). Substituenty jsou zde znázorněny šedou barvou a HA páteř je zbarvená podle tří použitých rozpouštědel – čisté vody (modře), směsi voda:dioxan (oranžově) a směsi voda:terc-butanol (zeleně).

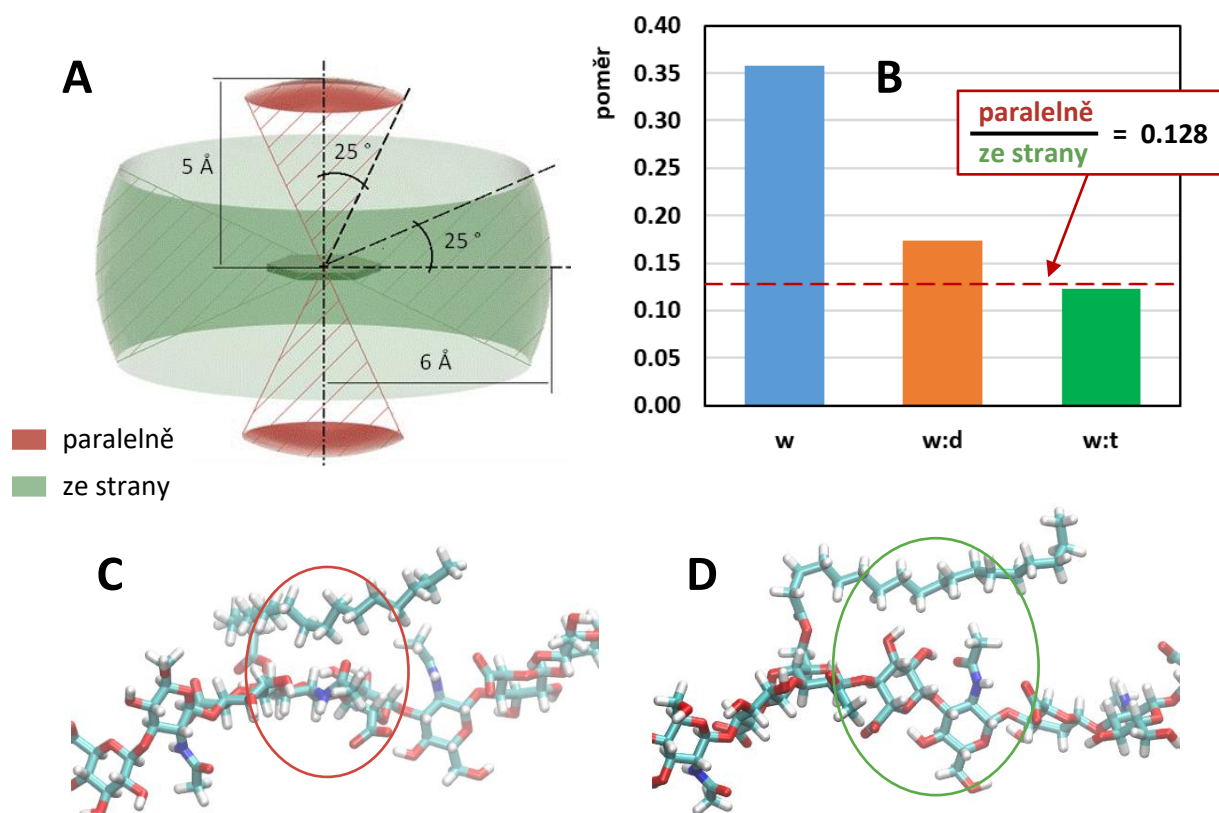
Z grafu je dále vidět mírný rozdíl mezi dioxanovou a terc-butanolovou směsí, pravděpodobně způsobený afinitou substituentů k terc-butanolovým mikrofázím. To podporuje i vizualizace řetězců ve spodní části Obr. 30, z níž vyplývá, že zatímco ve vodě se alifatické substituenty zdržují v blízkosti řetězce, v terc-butanolu téměř zcela ční do okolního prostoru. Směs s dioxanem pak představuje jakousi přechodnou variantu, kde mohou být řetězce i poblíž páteře, i natažené do prostoru.¹⁴

Zda orientace substituentů závisí na koncentraci soli, není možné z Obr. 30 jednoznačně určit. Zdá se sice, že ve směsných rozpouštědlech afinita substituentů

¹⁴ Tyto obrázky jsou samozřejmě hlavně ilustrační a zachycují, jak může konformace substituované HA v daných rozpouštědlech vypadat. Takovýto tvar sice substituenty nezaujímaly po celou simulační dobu, ale rozdíly ve středních hodnotách, uvedených v grafu jsou nezpochybnitelné.

k HA páteři s koncentrací iontů mírně klesá, zatímco ve vodě je po přidání soli naopak o něco vyšší (byť ne úměrně množství soli). Rozdíly jsou však velmi malé.

Dalším předmětem výzkumu byla orientace, v níž se alifatické substituenty přibližovaly k HA páteři. Z geometrického pohledu je možné v okolí sacharidových cyklů HA řetězce vymezit dva hraniční případy, kam může být substituent přitahován (Obr. 31): přiblížení „paralelně“, tedy axiálně, k sacharidovému cyklu, nebo přiblížení „ze strany“, tedy ekvatoriálně, k bočním OH skupinám (příklady obou variant jsou vizualizovány na Obr. 31C a Obr. 31D).



Obr. 31 – A: Schematická definice dvou vybraných oblastí, ze kterých se substituenty mohou přiblížit k řetězci. B: Graf poměru přiblížení substituentů z těchto dvou směrů v různých rozpouštědlech (ve srovnání s geometrickým poměrem objemů oblastí – přerušovaná čára). C: Vizualizace paralelního přiblížení. D: Vizualizace přiblížení ze strany.

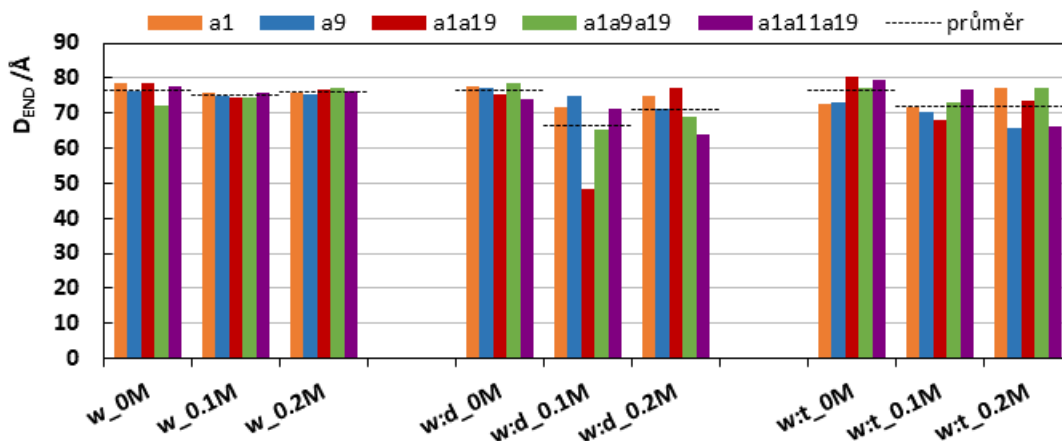
Přístup paralelně k cyklu odpovídá pozorované hydrofobní interakci mezi substituentem a HA residuem, naopak v případě přístupu ze strany je možné říct, že vliv hydrofobní interakce pravděpodobně nebyl velký (nebo minimálně ne dominantní). Pro obě tyto varianty byl geometricky definován odpovídající prostor

možného výskytu a byl napsán program, který četnost atomů v tomto prostoru vyhodnocoval.

Při čistě geometrickém porovnání objemů dvou zvýrazněných oblastí (rudá přerušovaná linka na Obr. 31B) je výrazněji více prostoru k přiblížení ze strany cyklů. Při srovnání poměrů orientací přiblížení substituentů v jednotlivých rozpouštědlech se ovšem zdá, že ve vodě (a také ve směsi voda:dioxan, byť ne v takové míře) je častá také paralelní, tedy hydrofobní interakce. Naproti tomu ve směsi vody a terc-butanolu je hydrofobních přiblížení téměř tolik, jak předpokládá geometrický poměr. Důvodem by mohla být obecně velmi nízká četnost přiblížení alifatických řetězců k HA páteři a také malá tendence terc-butanolem obklopených substituentů k hydrofobní interakci.

6.3.4 Vliv substituentů na ohebnost řetězců

Ohebnost řetězců byla opět posuzována pomocí měření vzdálenosti konců HA páteře. Z Obr. 32 lze vidět, že se její průměrná hodnota v čisté vodě pohybovala kolem 76 Å téměř bez ohledu na koncentraci soli. Stejnou hodnotu D_{END} pak vykazovaly dokonce i řetězce ve směsných rozpouštědlech s 0M koncentrací NaCl. Vzhledem k tomu, že konturová délka dekameru (dvaceti monosacharidových jednotek) HA je přibližně 100 Å, řetězce byly schopny ohybu, ale jen do určité míry.

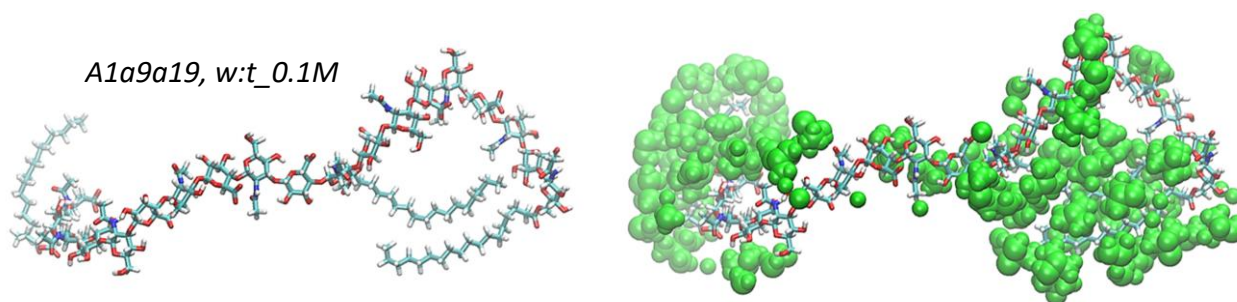


Obr. 32 – Vzdálenost konců (D_{END}) různě substituovaných řetězců HA

Už u nesubstituovaných řetězců bylo pozorováno, že ohebnost HA páteře zvyšuje jak přítomnost organické složky v rozpouštědle (u dioxanu výrazně víc, než u terc-butanolu), tak přítomnost iontů [183]. I u substituovaných řetězců byl vliv soli nepopíratelný. Rozdíl mezi dioxanem a terc-butanolem se zde ovšem zdál být téměř zanedbatelný.

Vliv substituentů na ohebnost se nejvíce projevovovala u vícečetně substituovaných systémů. Zatímco na narovnaném řetězci byla jakákoliv interakce mezi nimi nízká (podobně jako u dvojic samostatných alifatických řetězců „c“), následkem ohybu, když se substituenty přiblížily, mohlo mezi nimi docházet k hydrofobní interakci (a jejím vlivem i k dalšímu ohýbání). To bylo pozorováno zejména u systémů se třemi substituenty, kde byla větší šance na jejich alespoň částečné přiblížení (vždy aspoň dva substituenty na sebe byly schopny „dosáhnout“). Vlivem relativní rigidity HA páteře se však nemohly dostat dost blízko na to, aby měla jejich interakce trvalý ráz.

Ve směsích vody a terc-butanolu byly substituenty obalovány terc-butanolovými mikrodomény (Obr. 33), kdy v případě, že se substituenty přiblížily, mikrodomény se sice spojily v jednu velkou, ale k interakci mezi substituenty přes množství terc-butanolu stejně nedocházelo. To opět vedlo k ohýbání HA páteře a pravděpodobně to byl i jeden z hlavních důvodů, proč byla ohebnost substituovaných řetězců v terc-butanolu srovnatelná s řetězci v dioxanových směsích.

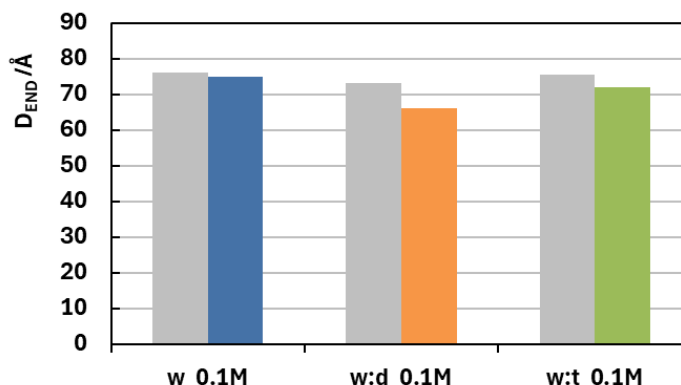


Obr. 33 – Řetězec HA se substituenty, orientovanými dovnitř terc-butanolových mikrodomén (vlevo) s vizualizací molekul terc-butanolu do vzdálenosti 5 Å od řetězce (vpravo).

Míru vlivu substituce lze vidět i ze srovnání vzdálenosti konců nesubstituovaných a substituovaných řetězců. Jelikož byly u nesubstituovaných řetězců simulovány pouze dvě koncentrace soli (0 M a 0.1 M) a v obou systémech ohebnost řetězce narůstala až v přítomnosti NaCl, byly do grafu vyneseny pouze hodnoty pro 0.1M koncentraci NaCl. Zatímco u nesubstituovaných systémů byly průměry lineárně extrapolovány z výsledků dvou dříve zkoumaných teplot na 298.15 K, za které byly simulovány ostatní systémy, u substituovaných řetězců byly průměrovány všechny varianty substituce.

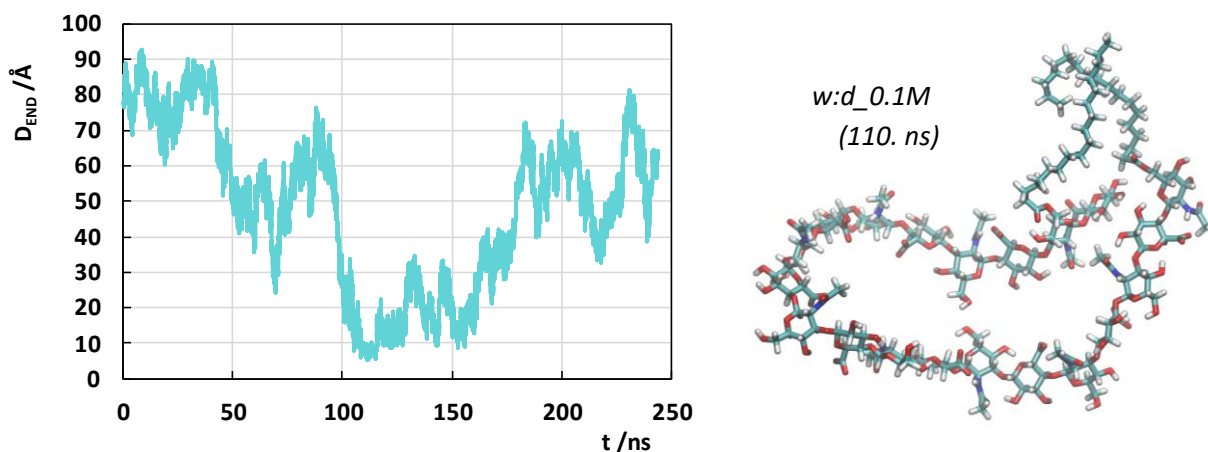
Při 0.1M koncentraci soli se substituované řetězce u všech pozorovaných systémů ohýbaly víc, než bylo pozorováno u jejich nesubstituovaných protějšků (Obr. 34). Nejmenší rozdíl byl v čisté vodě, protože substituenty ve vodě zůstávaly spíše v blízkosti HA páteře a na ohebnosti se podílely jen minimálně. V terc-butanolu byly substituenty důvodem ohebnosti řetězců jen nepřímo. V dioxanu však nebyla jejich

hydrofobní interakce s páteří tak silná, a naopak ohebnost páteře byla vlivem rozpouštědla výrazně vyšší, díky tomu docházelo k přiblížení substituentů častěji.



Obr. 34 – Průměrná vzdálenost konců (D_{END}) nesubstituovaných (šedé sloupce) a substituovaných řetězců HA (barevné sloupce) při 0.1M koncentraci NaCl. Odchytky nejsou uvedeny, jelikož byly řádově menší než zobrazené hodnoty.

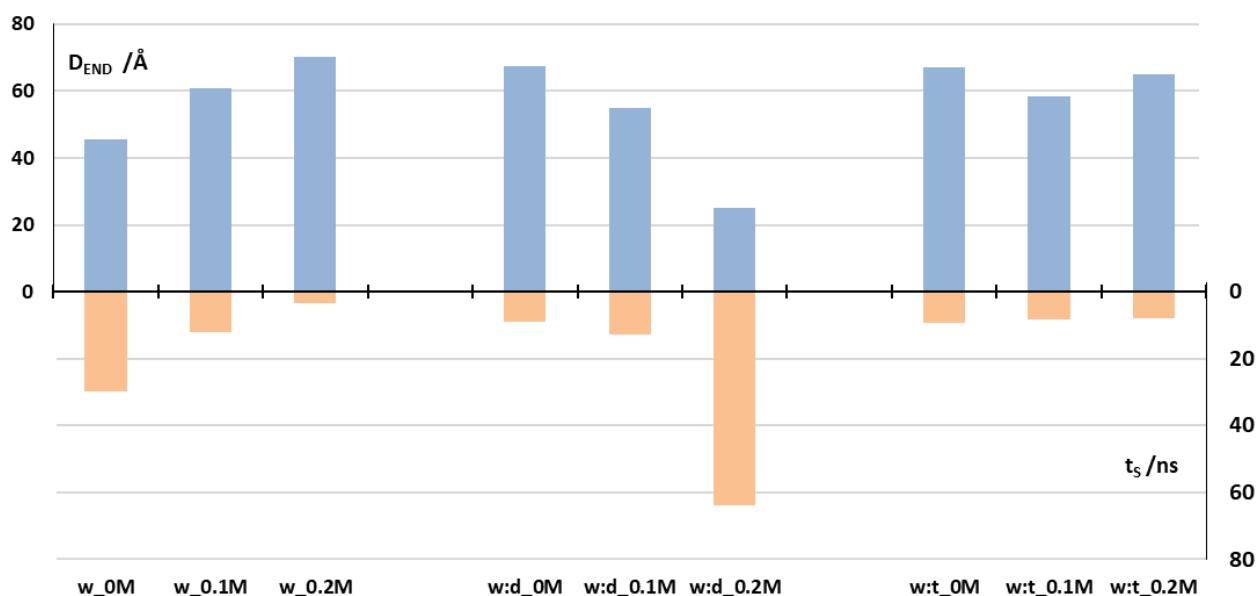
Jednoznačně nejmenší vzdálenost konců mezi substituovanými řetězci pak vykazoval systém se dvěma substituenty (a1a19) a to právě ve směsi w:d_0.1M – tedy v prostředí, ve kterém se u nesubstituovaných řetězců samovolně zformovala dvoušroubovice. V průběhu simulace tohoto systému se řetězec dokonce ohnul do takové míry, že došlo k interakci mezi jeho dvěma konci (viz časový vývoj D_{END} systému a1a19 na Obr. 35). Od okamžiku, kdy se řetězec stočil, byl navíc ve své nové pozici podporován přetočenými dihedrálními úhly na HA páteři, interakcí vlastních konců ale také hydrofobním působením mezi substituenty.



Obr. 35 – Časový průběh vzdálenosti konců řetězce v systému a1a19_w:d_0.1M (vlevo) a konformace řetězce v okamžiku ohnutí (vpravo)

Pro otestování stability vzniklé konformace (Obr. 35, vpravo) byla struktura spolu s ionty v nejbližším okolí¹⁵ přenesena také do ostatních prostředí. Žádné z nich nebylo schopné ji stabilizovat – ve všech nakonec došlo k přerušení interakce HA konců i substituentů a následnému narovnání řetězce. Doba, kterou tento proces trval, se však mezi jednotlivými rozpouštědly a koncentracemi soli mnohdy i výrazně lišila.

Rychlost narovnání řetězců je vidět z grafu na Obr. 36, kde oranžové sloupce znázorňují, jak dlouho se řetězec udržel ve stočené pozici (resp. za jak dlouho došlo k jeho narovnání). Tomu pak odpovídá vzdálenost jeho konců ve sloupcích modrých (průměrovaná z prvních 105 ns každé simulace).



Obr. 36 – Průměrná vzdálenost konců řetězce v různých prostředích (modře) ve srovnání s časem separace – tedy s dobou, za kterou vzdálenost konců narostla na minimálně 30 Å (oranžově).

K nejvýznamnější stabilizaci došlo v systému w_d_0.2M, což částečně odpovídá pozorování HA dvoušroubovice, přenesené do různých prostředí (která se právě v dioxanu velmi pěkně stabilizovala, i když tam nezáviselo na koncentraci soli [184]). I zde eventuálně došlo k narovnání řetězce, ale stalo se to mnohem později, než u 0.1M nebo pouze neutralizované dioxanové směsi.

V systémech s terc-butanolem docházelo k separaci konců prakticky okamžitě, což odpovídá předchozím pozorováním, že řetězce v terc-butanolu jsou obvykle

¹⁵ To bylo v tomto případě stanoveno do vzdálenosti 2.5 Å, opět po otestování různých variant. Díky tomu bylo v okolí řetězce už na počátku každé simulace minimálně devět Na⁺ iontů.

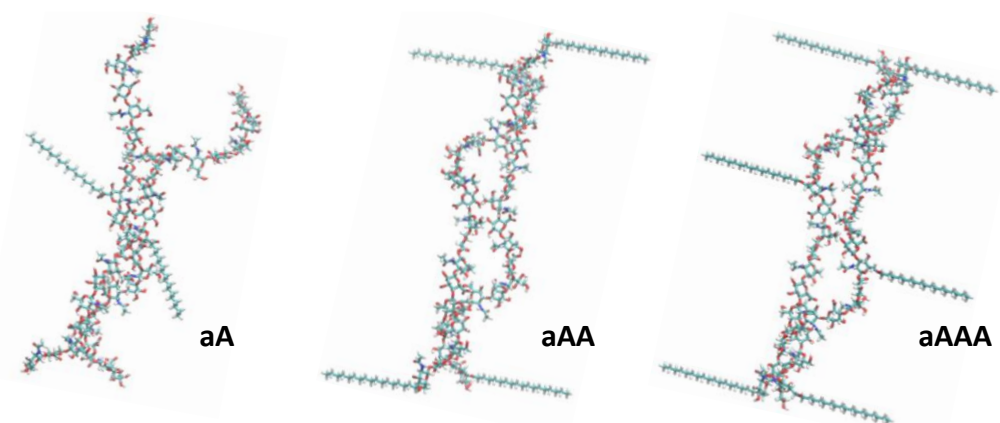
poměrně narovnané, a stabilizující hydrofobní interakce substituentů je v takovémto prostředí téměř nulová. Koncentrace NaCl pak u směsí s terc-butanolem neměla žádný vliv.

Naproti tomu ve vodě připomínala závislost mezi koncentrací soli a stabilitou stočeného řetězce nepřímou úměrnost, což ale šlo proti většině doposud zmíněných předpokladů. Hydrofobní interakce, kterou se konce řetězce udržují ve stočené pozici a ve vzájemné blízkosti, by měla s rostoucím množstvím soli (a tudíž i s rostoucí polaritou prostředí) růst, stejně jako ohebnost HA. Řetězce by se tak měly držet v ohnutém tvaru mnohem déle. Proto byla provedena další analýza: měření dihedrálních úhlů mezi sacharidovými cykly HA páteře.

U systému a1a19, jehož konce se ve směsi voda:dioxan výrazně přiblížily k sobě, bylo zaznamenáno hned několik rotací kolem úhlů 13_1 a 14_2. V okamžiku jeho přesunutí do ostatních prostředí byl pak jeden z 13_1 úhlů přetočený o 180° (což zde dopomáhalo deformovanému tvaru řetězce). Rotace tohoto typu je ovšem v čisté vodě nepřirozená a v reakci na ni došlo k velmi hojným rotacím úhlů 14_2 (a v 0M čisté vodě dokonce i k několika změnám úhlů 13_2). Dynamické přetáčení vazeb (a s tím související více či méně úspěšná snaha o stabilizaci) by tak u tohoto dvoj-substituovaného řetězce mohlo být oním chybějícím faktorem, který způsobil překvapivý trend systémů ve vodě na Obr. 36. Dalším možným vysvětlením je, že rostoucí koncentrace sodných iontů zvýšila afinitu substituentů k páteři a obecně k ohýbání a ty proto neměly takovou tendenci k interakci mezi sebou. To by se ovšem projevilo až po částečném narovnání páteře, které by mohlo být způsobeno náhodným pohybem molekuly nebo právě rotací dihedrálních úhlů.

6.4 Simulace dvou substituovaných řetězců HA

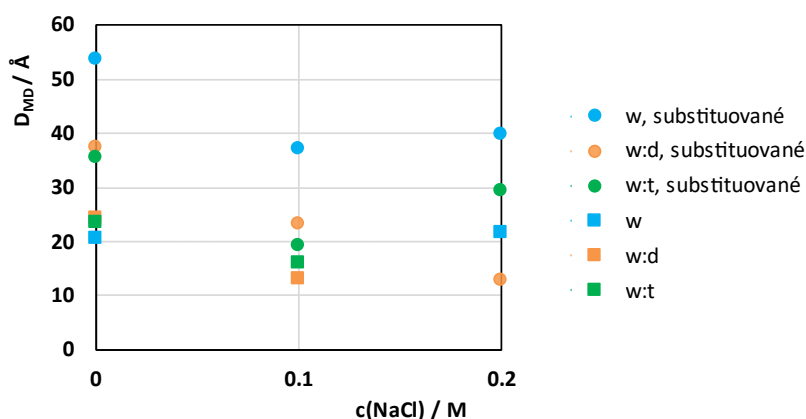
Pro simulaci interakcí více substituovaných řetězců byly vybrány systémy a9, a1a19 a a1a11a19 (zkratky vysvětleny na Obr. 25), dále označované jako aA, aAA a aAAA (Obr. 37). Řetězce byly navzájem orientovány antiparalelně, opět bylo provedeno přes 200 ns simulací pro každý z těchto systémů a to ve všech variantách rozpouštědel (čistá voda, směs voda:dioxan i směs voda:terc-butanol při 0M, 0.1M a 0.2M koncentrací soli). Velikost simulačního boxu byla (120 Å)³ a mimo HA a iontů se zde nacházelo 27 200 molekul vody na 4 900–5 300 molekul organické složky.



Obr. 37 – Počáteční konformace dvojic substituovaných řetězců.

6.4.1 Afinita substituovaných hyaluronanových řetězců

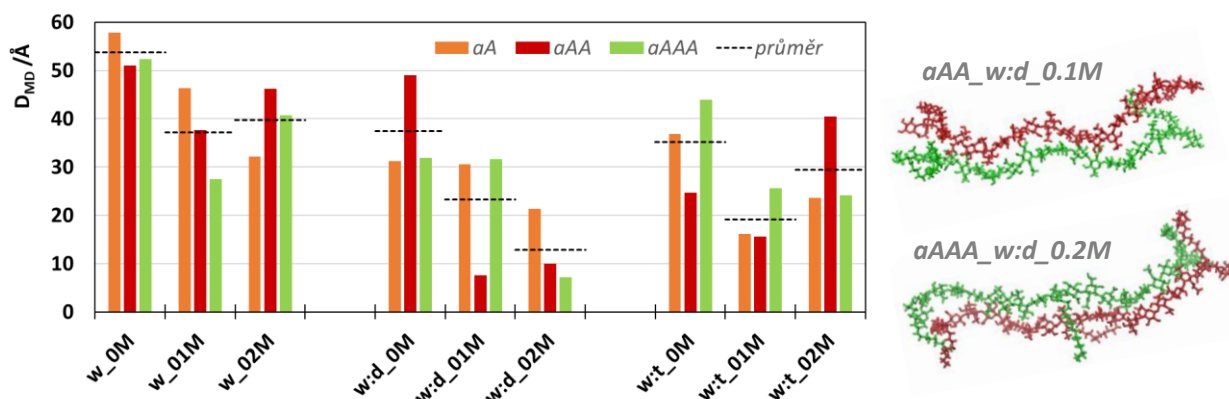
Nejjednodušším znázorněním toho, zda mezi řetězci může docházet k interakci, je výpočet jejich střední vzdálenosti D_{MD} . Ze srovnání D_{MD} mezi substituovanými a nesubstituovanými řetězci (Obr. 38) se zdá, že ty substituované se k sobě nedostanou tak blízko, jako řetězce nesubstituované. Důvody nemusí být jen sterické – jak jsou substituenty hydrofobně přitahovány do vzájemné blízkosti, velmi často se setkají právě v prostoru mezi dvěma řetězci, čímž brání dalšímu přiblížení.



Obr. 38 – Srovnání průměrných hodnot střední vzdálenosti řetězců (D_{MD}) mezi všemi substituovanými (kulaté body) a všemi nesubstituovanými antiparalelně orientovanými HA řetězci (hranaté body).

Předchozí hypotézu, že se řetězce oproti svým nesubstituovaným protějškům nedostanou tak blízko k sobě, však není možné zcela generalizovat. Při podrobnějším srovnání D_{MD} jednotlivých systémů (Obr. 39) je vidět, že vzdálenosti řetězců jsou silně ovlivněny nejen volbou rozpouštědla a koncentrace soli, ale i počtem substituentů. Některé systémy se pak výše zmiňované hypotéze zcela vymykají,

zejména aAA_w:d s nenulovou koncentrací soli, (vizualizované v pravé části Obr. 39).



Obr. 39 – Přehled průměrné střední vzdálenosti mezi substituovanými HA řetězci (vlevo) a vizualizace systémů, které se k sobě nejvíce přiblížily (vpravo).

V čisté vodě se k sobě řetězce přibližovaly pouze za přítomnosti soli. Ani v tom případě ovšem nešlo o dlouhodobé interakce a nejpozději po pár desítkách nanosekund opět docházelo k separaci.

Ve směsi voda:dioxan zůstávaly řetězce ve vzájemné blízkosti podstatně déle (viz Obr. P1). Byl zde jasně patrný vliv množství NaCl na vzdálenosti mezi řetězci, způsobený mimo jiné formací iontových mostů, diskutovaných v následující podkapitole. Naproti tomu u hodnot získaných ze simulací v terc-butanolu nebyl mezi vzdáleností řetězců a koncentrací soli vidět žádný reprodukovatelný trend. I přesto se zde řetězce nacházely podstatně blíže než ve vodě.

V pravé části Obr. 39 jsou zobrazeny systémy, které se nejvíce zdržovaly ve vzájemné blízkosti. Oba byly simulovány ve směsi voda:dioxan, a přestože řetězce zde přímo netvořily dvoušroubovici (jako tomu bylo u nesubstituovaných řetězců), vzniklá duplexní struktura byla v obou případech velmi stabilní a vydržela přes 200 ns.

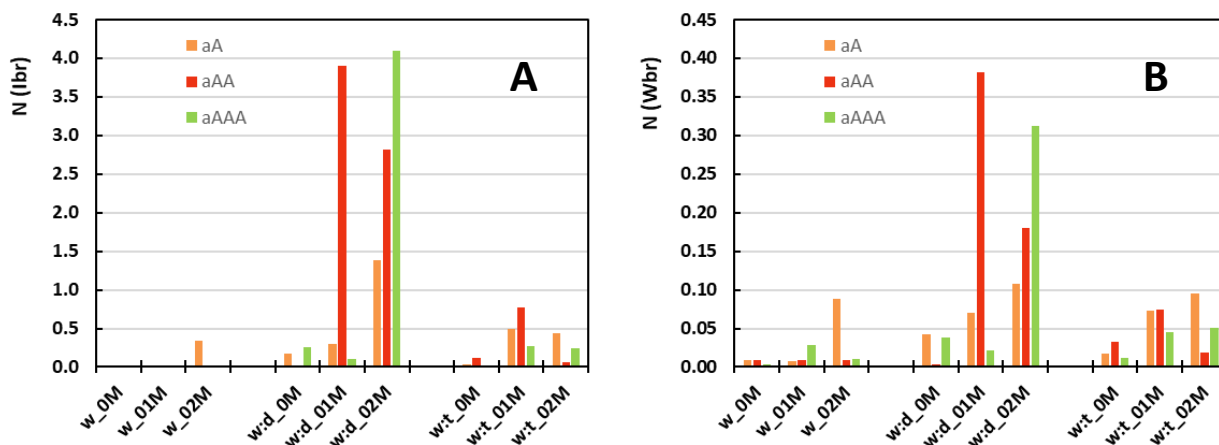
Časový vývoj střední vzdálenosti je k nalezení v přílohách. Je z něj vidět, že při průměrování všech koncentrací soli (Obr. P2) měl časový vývoj střední vzdálenosti řetězců velmi podobný průběh bez ohledu na typ rozpouštědla. Zatímco u aA D_{MD} velmi rychle narůstala na cca 50 Å, u vícečetně substituovaných řetězců se většinu času udržovala mezi 20 a 40 Å (u dvoj-substituovaných systémů aAA dokonce vzdálenost většinu simulační doby nepřekročila 30 Å). V případě započítání jen těch systémů, které obsahují sůl (Obr. P3), už byl rozdíl mezi rozpouštědly viditelnější. Efekt je vidět převážně u systémů aAA, kde je střední vzdálenost řetězců ve směsích vody:dioxanu po celou dobu simulace velmi nízká. Ve směsi vody:terc-butanolu se

D_{MD} pohybuje kolem 20 Å a v průběhu simulace nejprve narůstá, ale pak klesá až na úroveň dioxanových směsí. Naopak ve vodě se řetězce v průběhu simulace vzdalují.

6.4.2 Typy interakcí mezi substituovanými řetězci

Ve chvílích, kdy se řetězce dostaly do vzájemné blízkosti, byla jejich interakce zprostředkovávána vodíkovými, iontovými a v menší míře také vodními mosty. Zatímco ve směsích s dioxanem bylo iontových mostů velké množství (viz Obr. 40) a ionty významně přispívaly k interakcím řetězců, v čisté vodě tyto mosty nehrály téměř žádnou roli s malou výjimkou systému aA_w_0.2M. To odpovídá srovnání s nesubstituovanými řetězci, kde dvoušroubovici (i jí podobné duplexní formace, původně vytvořené v dioxanových směsích) stabilizovaly právě iontové mosty. Těch vznikalo velké množství, protože se v dioxanových směsích v okolí HA řetězců obecně vyskytovalo velké množství iontů.

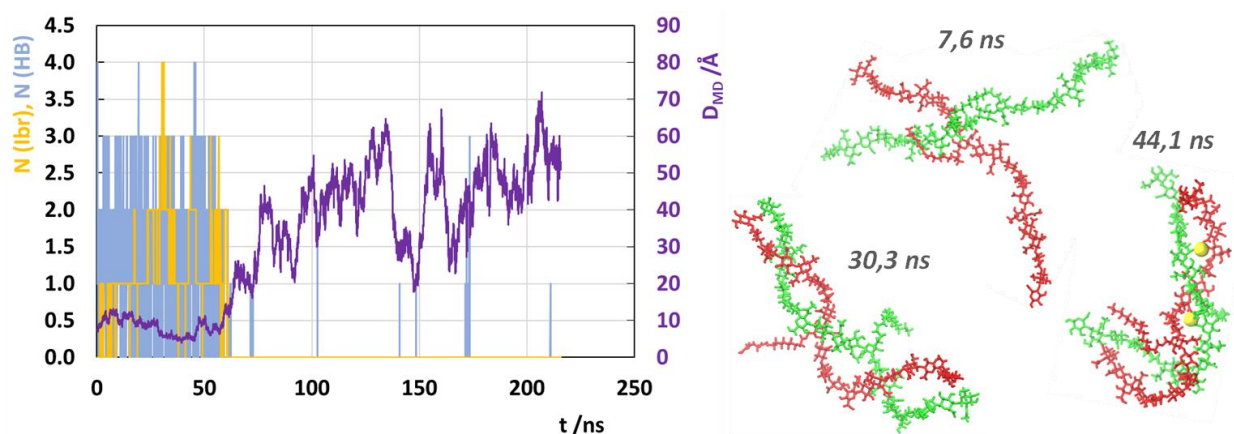
Iontové mosty se v menší míře formovaly i ve směsích vody s terc-butanolem (za nenulové koncentrace NaCl), (když jejich absolutní počet byl výrazně menší než v dioxanu. Pravděpodobným vysvětlením jejich přítomnosti v terc-butanolových směsích by mohla být vysoká tendence rozpouštědla k fázové separaci. Veškeré ionty se zdržovaly v oblastech bohatších na vodu, tedy v okolí HA páteře. Ionty tak měly příležitost k interakci s řetězci (a ke zprostředkování interakce mezi nimi).



Obr. 40 – Průměrná hodnota počtu iontových (A) a vodních (B) mostů v jednom simulačním kroku.

Efekt vodních mostů byl výrazně slabší a trendy zde převážně odpovídaly tomu, co bylo pozorováno u iontových mostů. I zde byla interakce nejsilnější za přítomnosti dioxanu, v terc-butanolových směsích jí bylo málo a ve vodě nebyla téměř žádná s malou výjimkou systému aA_w_0.2M. V tomto systému došlo (pravděpodobně vlivem náhodného tepelného pohybu) ke krátkodobé stabilizaci

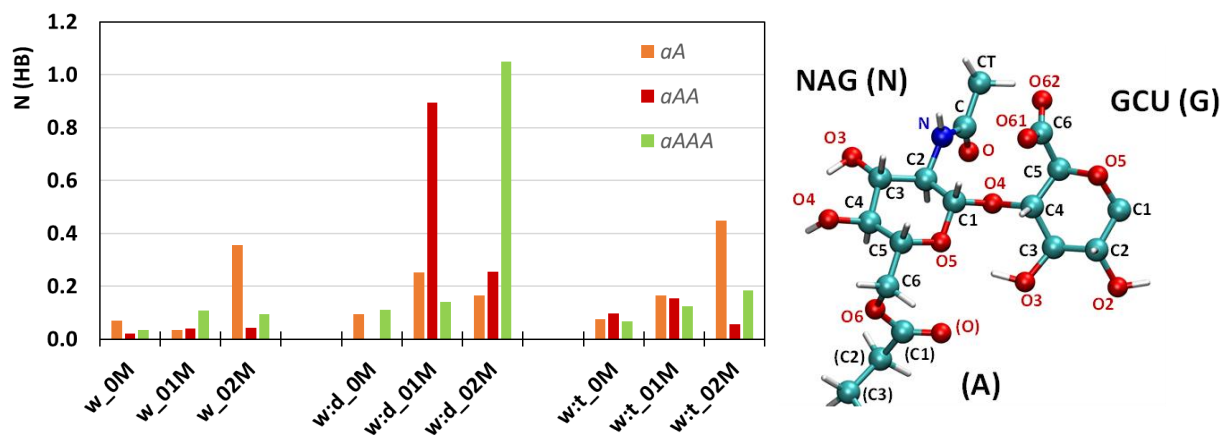
počáteční konformace řetězců. Ty se pak od sebe vzdálily až po více než 50 ns (viz Obr. 41). Zůstaly tedy u sebe více než trojnásobně déle než všechny ostatní systémy v čisté vodě a také značné množství systémů ve směsných rozpouštědlech. Kompletní přehled časových vývoji všech dvojic substituovaných systémů je uveden v přílohách na Obr. P4.



Obr. 41 – Časový vývoj střední vzdálenosti řetězců D_{MD} a počtu iontových mostů (Ibr) a vodíkových vazeb (HB) mezi nimi v průběhu simulace systému $aA_w_0.2M$ (vlevo). Pravá část obrázku představuje vizualizaci řetězců tohoto systému v průběhu simulace.

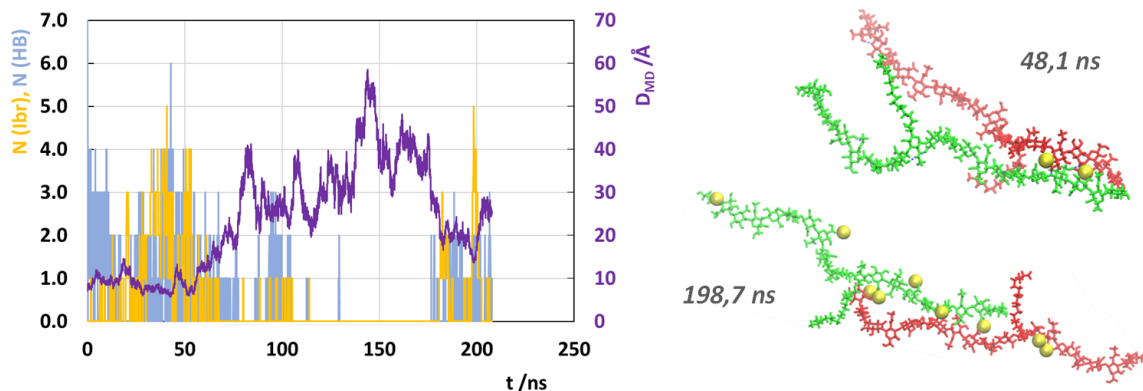
Důvod, proč se řetězce tak dlouho držely ve vzájemné blízkosti, byl ten, že se nejprve zachytily prostřednictvím substituentů (kdy jeden z nich zcela obtočil druhý řetězec). Následně (cca ve 30. ns) se kolem sebe oba řetězce ovinuly téměř v náznaku dvoušroubovicové struktury, udržované jak hydrofobní interakcí, tak iontovými mosty. Obě tyto interakce jsou dobře vidět zejména na snímku ze 44. ns (Obr. 41), kde je substituent červeného řetězce hydrofobně přitahován k řetězci, znázorněnému zelenou barvou, a zároveň je mezi nimi možné pozorovat iontové mosty.

Mezi substituovanými HA řetězci se tvořily také vodíkové vazby, jejichž četnost v jednotlivých systémech ukazuje Obr. 42. Stejně, jako tomu bylo u iontových a vodních mostů, i zde docházelo k interakci hlavně ve směsích s dioxanem (kdy maximální interakce byla pozorována u systémů, jejichž D_{MD} byla nejnižší a jejichž vizualizace je součástí Obr. 39). V systémech s terc-butanolem se HB také nacházely, ale bylo jich výrazně méně, než v přítomnosti dioxanu. Ve vodě se pak řetězce poměrně rychle vzdálily od sebe, čímž byla tvorba HB téměř znemožněna.



Obr. 42 – Průměrný počet vodíkových vazeb na jeden krok simulace (vlevo) a vpravo přehled označení atomů substituované HA (včetně případného alifatického substituentu).

Na první pohled patrnými výjimkami (mimo prostředí dioxanu) byly už diskutovaný systém aA_w_0.2M a potom také aA_w:t_0.2M (Obr. 43). Zde opět došlo k výrazné stabilizaci řetězců pomocí vodíkových vazeb (ale také iontových a vodních mostů). Podobně jako u většiny ostatních systémů se řetězce eventuálně separovaly, po opětovném náhodném přiblížení však pokračovaly v interakci, tentokrát překvapivě v paralelním uspořádání. Střední vzdálenost mezi nimi byla o něco větší, když byly orientovány antiparalelně, ale zato se tvořilo víc Ibr.

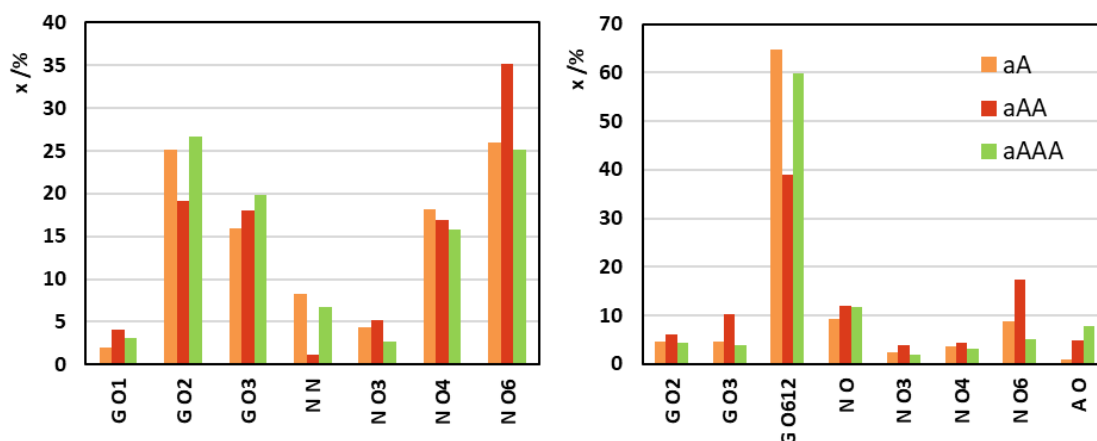


Obr. 43 – Časový vývoj střední vzdálenosti řetězců (D_{MD}) a počtu iontových mostů (Ibr) a vodíkových vazeb (HB) mezi nimi v průběhu simulace systému aA_w:t_0.2M (vlevo). Pravá část obrázku představuje vizualizaci řetězců tohoto systému v průběhu simulace.

U vodíkových vazeb byla opět provedena analýza, které boční skupiny HA řetězce se na HB podílely. Přehled nejčastějších¹⁶ donorů a akceptorů (Obr. 44) ukazuje, že

¹⁶ Výjimečně vznikaly vazby i na jiných skupinách (např. na glykosidických kyslících či na kyslících O5, které byly součástí cyklů). Jednalo se však jen o velmi malý procentuální podíl.

systemy aA a aAAA (tedy ty se substituenty uprostřed řetězce) tvořily podobné typy HB, jako řetězce bez substituentů [92]. Mezi nejběžnější donory se řadily OH skupiny na G_C2 a N_O6, jednoznačně nejčastějším akceptorem pak byla záporně nabitá karboxylová skupina na GCU. Vazby na ni zde byly ještě o něco četnější než u nesubstituovaných řetězců.

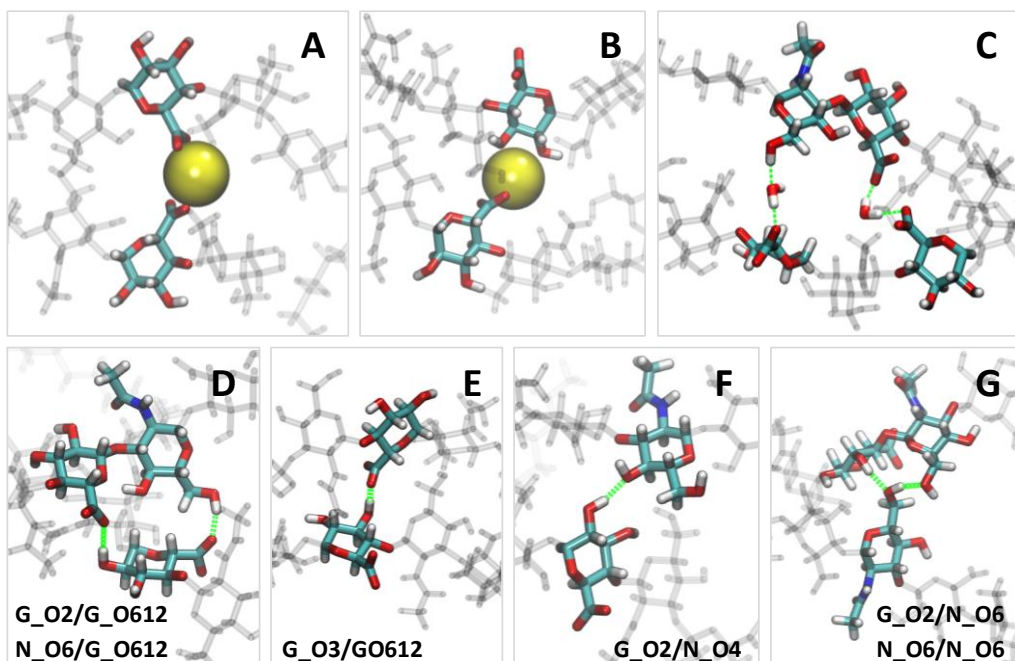


Obr. 44 – Kumulativní graf atomů, nejčastěji se podílejících se na vodíkových vazbách v roli donorů (vlevo) a akceptorů (vpravo) mezi substituovanými řetězci. Hodnoty byly průměrovány mezi všemi druhy rozpouštědel. Pro používané značení atomů viz Obr. 42.

Systemy aAA, tedy ty, které měly substituenty pouze na koncích řetězců, se chovaly trochu jinak. I zde byly velmi časté vazby na karboxylovou skupinu, ale kromě nich se zde tvořily i jiné HB, například mezi dvěma OH skupinami na šestém uhlíku NAG (viz Obr. 45). I proto se konfigurace aAA lišila také tím, že zatímco u aA i aAAA převažovaly vazby na GCU (stejně jako tomu bylo u nesubstituovaných systémů), u dvoj-substituované HA se na vazbách výrazně častěji podílel i NAG. V některých směsích s dioxanem, dokonce tvořily vazby typu NAG – NAG až padesát procent všech HB.

Změnou oproti nesubstituovaným řetězcům byly také HB na kyslík A_O (tedy kyslík esterové skupiny alifatického substituentu). Ty vznikaly hlavně ve vodném prostředí, a to zejména u dvoj-substituovaných řetězců, kde tvořily až 15 % všech přítomných HB (v organických rozpouštědlech jich naopak vznikalo poměrně málo, proto je jejich průměrný počet v grafu na Obr. 44 téměř zanedbatelný).

Přehled nejběžnějších interakcí ukazuje Obr. 45. Na obrázcích A a B jsou znázorněny dva nejčastější způsoby tvorby iontového mostu – tedy mezi karboxylovými skupinami nebo mezi jednou karboxylovou skupinou a OH skupinami na druhé straně GCU. Případné vodní mosty se tvořily mezi prakticky všemi OH skupinami na řetězcích (viz Obr. 45C).



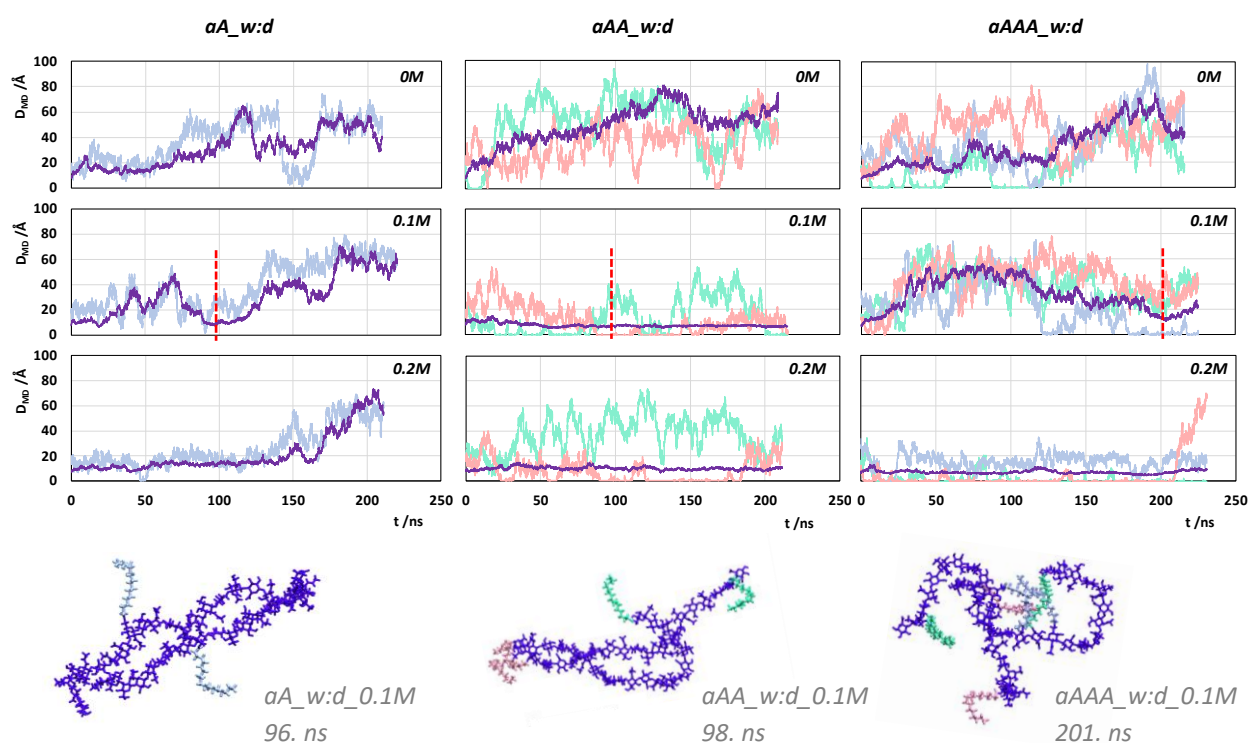
Obr. 45 – Vizualizace různých typů interakcí mezi substituovanými řetězci – iontové mosty (A, B), vodné mosty (C) a nejčastější typy vodíkových vazeb: (D – G).

Z vodíkových vazeb jsou na Obr. 45 uvedeny jen ty nejtýpichtější – vazby na karboxylovou skupinu (D, E), vazby na OH skupiny naproti té karboxylové, tedy na uhlících G_C2 a G_C3 (D, E, F) a také vazba mezi dvěma N_O6 (G), která byla běžnější v aAA systémech.

6.4.3 Interakce alifatických substituentů

Vliv substituentů na interakci HA řetězců je komplexní. Na jednu stranu hrají roli sterické faktory, kdy se HA řetězce nemohou přibližovat tak snadno, jako by to bylo možné bez nich. Hydrofobní interakce substituentů různých řetězců nebo případně přichylování substituentů k jinému HA řetězci však interakci naopak podporuje.

Při srovnání časového vývoje střední vzdálenosti řetězců (Obr. 46), závisel průběh křivek na četnosti substituce. U systémů s jedním substituentem měly D_{MD} řetězců a substituentů velmi podobný průběh. Už u dvou substituentů však mnohdy docházelo k tomu, že zatímco jedna dvojice substituentů zůstávala ve vzájemné blízkosti, druhá se zcela vzdálila. Z grafů je tak poznat, zda se k sobě řetězce přibližovaly alespoň přibližně rovnoběžně (a případná interakce probíhala po celé délce), nebo zda docházelo k jejich ohýbání (a do interakce se zapojila pouze část každého řetězce).



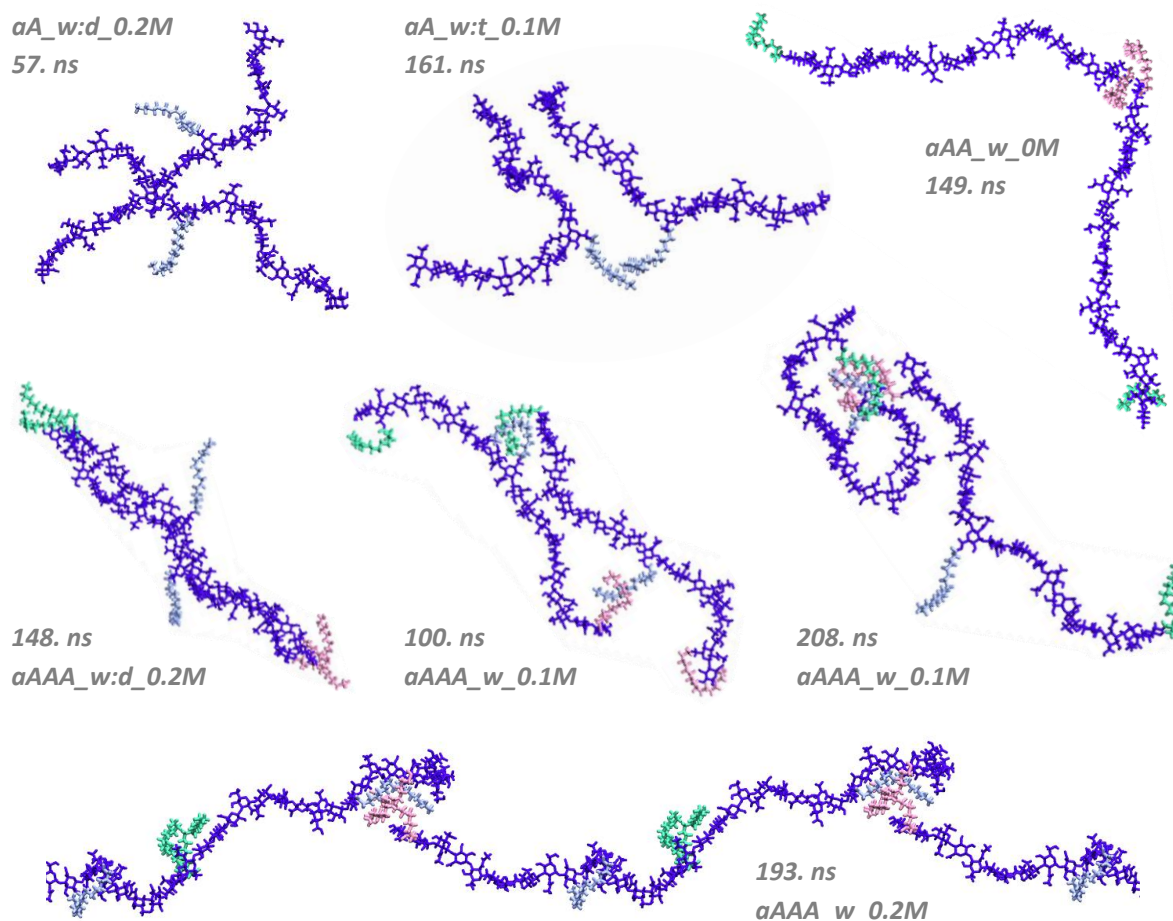
Obr. 46 – Časový vývoj střední vzdálenosti (D_{MD}) substituovaných řetězců (fialově) ve směsném rozpouštědle voda:dioxan, D_{MD} mezi substituenty na r9 (modře), substituenty na r1 jednoho řetězce a r19 druhého (tyrkysově) a naopak substituenty na r19 jednoho a r1 druhého řetězce (ružově). Ve spodní části obrázku jsou zachyceny snímky vybraných systémů (časový bod jejich porážení je v grafech označen červenou čarou).

V případě trojnásobně substituovaných HA zůstávaly řetězce jen málokdy v původní antiparalelní poloze. Díky nejrůznějším vzájemným posunutím pak substituenty mohly interagovat téměř jakkoliv (tedy v mezích toho, co jim dovolila ohebnost řetězců či distribuce rozpouštědla v okolí). Proto lze například u systému aAAA_w:d_0.1M (Obr. 46) vidět hydrofobní interakci hned čtyři substituentů. Ta sice řetězce alespoň částečně udržovala ve vzájemné blízkosti, ale k tvorbě iontových mostů nebo vodíkových vazeb mezi nimi téměř nedocházelo. Časový vývoj pro zbylá dvě rozpouštědla je k vidění v přílohách v Obr. P5.

Další zajímavé konformace, způsobené či minimálně ovlivněné vzájemnou interakcí substituentů, jsou ukázány na Obr. 47. Díky tomu, že řetězce nebyly fixovány na místě, docházelo často k jejich vzájemnému posunutí a ohýbání (viz oba snímky systému aAAA_w_0.1M). To mnohdy ústilo ve stav, kdy nebylo možné určit, zda jsou vůči sobě orientovány paralelně, nebo antiparalelně. Při vzájemné interakci zprostředkované substituenty však již toto rozlišení bylo bezpředmětné.

Zejména u dvojnásobně substituovaných řetězců pak také vlivem vzdalování HA páteře řetězců a afinity jejich substituentů docházelo k situacím, kdy interagovala

pouze jediná dvojice substituentů a výsledná konformace připomínala písmeno V či L (jak ilustruje vizualizace systému *aAA_w_0M*). V systému *aAAA_w_0.2M* se pak ze stejného důvodu dostaly řetězce do takové pozice, že spolu díky periodickým podmínkám mohly interagovat na obou stranách. Vznikl tak jakýsi (v rámci simulace) nekonečný řetěz mnoha HA segmentů, propojených svými alifatickými substituenty (zelenými na jedné straně a růžovými na straně druhé).



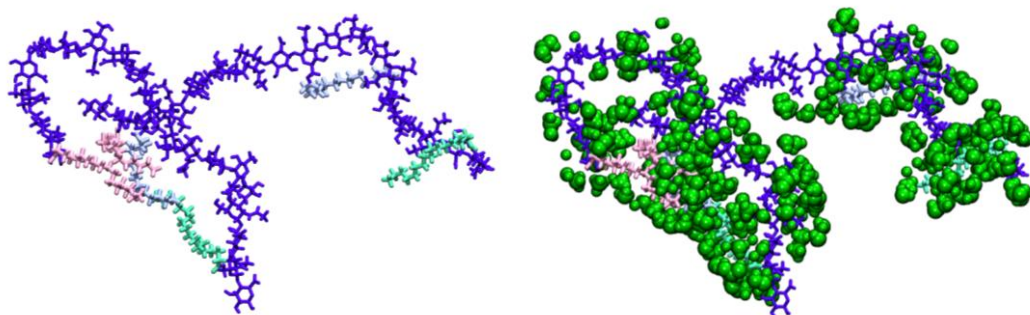
Obr. 47 – Ukázka nejrůznějších konformací řetězců, ovlivněných interakcí substituentů. Barevné značení odpovídá tomu na Obr. 46, tedy fialová pro HA páteř a růžová, zelená a modrá pro jednotlivé substituenty.¹⁷

6.4.4 Dynamika substituovaných řetězců hyaluronanu

Dynamika substituovaných řetězců byla kromě jejich vzájemné interakce ovlivněná také rozpouštědlem. Stejně jako u samostatných řetězců se rozpouštědlo

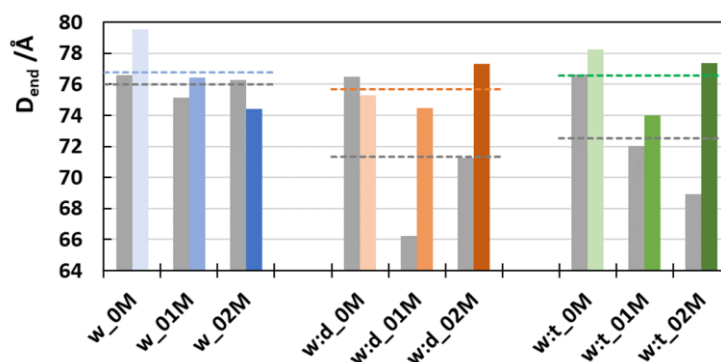
¹⁷ Kromě označení systémů, ve kterých se daná konformace zformovala, je zde uveden i čas, ze kterého každý snímek pochází. Jelikož barevné značení odpovídá Obr. 45 a Obr. P4 (v přílohách), je možné každý ze systémů dohledat a porovnat jeho grafické znázornění s příslušnými hodnotami D_{MD} .

v blízkosti řetězce separovalo, a zatímco organická část se zdržovala v blízkosti substituentů (viz Obr. 48), voda a ionty v ní byly přitahovány k HA páteři. Při vyhodnocení distribuce kolem celých substituovaných systémů pak převládala voda (a to nepřímo úměrně množství substituentů). RDF měly totožný průběh, jako u samostatných substituovaných řetězců (tedy Obr. 26–29).



Obr. 48 – Systém *aAAA_w:t_0.1M*, 160. ns (vlevo). Distribuce molekul *tert*-butanolu (zeleně) ve vzdálenosti do 4 Å od řetězců tohoto systému (vpravo).

Ohebnost jednotlivých substituovaných řetězců na rozpouštědle nezávisela. Respektive vliv rozpouštědla zde byl kompenzován vlivem druhého řetězce. Srovnání průměrné vzdálenosti konců pro samostatné substituované řetězce a jejich dvojice (u dvou řetězců jde o průměr přes oba řetězce) ukazuje Obr. 49. Rozdíl není velký (graf nezačíná v nule), ale přesto se zdá, že vzájemné interakce řetězců neponechávají téměř žádný prostor pro případný ohyb. Nejlépe je to vidět u řetězců *w:d_0.1M*, nebo *w:t_0.2M*.



Obr. 49 – Vzdálenost konců (D_{END}) interagujících substituovaných HA řetězců (barevné sloupce) a samostatných substituovaných řetězců (šedé sloupce). Průměrné hodnoty pro jednotlivá rozpouštědla jsou označeny přerušovanou čarou.

Naopak ohebnost jednotlivých substituentů na rozpouštědle závisela – průběh D_{END} pro jednotlivé alifatické řetězce byl totiž totožný, jako když byly simulovány

samostatně. Ve vodě tedy docházelo k nejčastějšímu ohýbání a přichylování k HA páteři (ať už řetězce, na kterém byl substituent naroubován, nebo řetězce druhého), naopak ve směsích s terc-butanolem zůstávaly substituenty převážně v narovnaném stavu a maximálně odchýleny od obou HA řetězců.

Dynamika dvojic substituovaných HA řetězců a míra jejich vzájemné interakce tedy významně závisí na prostředí, ve kterém jsou simulovány, ale také na množství a umístění alifatických substituentů. I na ně však má přímý vliv volba rozpouštědla. Regulací prostředí (poměru vody a organické složky, specifickou koncentrací NaCl) by tak mělo být možné ovlivnit nejen míru substituce, ale také její pravidelnost a tím pádem také výsledné vlastnosti finálního modifikovaného produktu.

7. Přínos pro vědu a praxi

Kyselina hyaluronová je v současnosti široce využívána v mnoha medicínských a kosmetických odvětvích díky svým unikátním visko-elastickým vlastnostem. Výzkum modifikací HA, zejména pro farmaceutické aplikace, jako jsou nosiče léčiv, je v dnešní době velmi žádaný. Za tímto účelem probíhá vývoj různě modifikovaných variant hyaluronanu. Přestože existuje množství způsobů a forem HA modifikací, optimalizace podmínek jejich přípravy ještě nejsou zcela pochopeny a vyžadují hlubší vědecké poznání.

Simulace směsných rozpouštědel a distribuce organických molekul ve vodě jsou obecně v literatuře pokryty jen velmi málo, a přitom jejich pochopení by mohlo velmi pomoci při praktických aplikacích. Hlavním přínosem této práce je proto právě lepší porozumění vlivu rozpouštědel a substituentů na strukturu a chování hydrofobního hyaluronanu, konkrétně ve směsích voda:dioxan a voda:terc-butanol (se zaměřením na vliv fázové separace rozpouštědla, ale také vliv sodné soli a přítomnosti dalších substituovaných řetězců). Toto porozumění je klíčové nejen pro jeho aplikace v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství, ale také ve farmacii a kosmetice, kde je dnes po využití HA velká poptávka. [6]

Mimo teoretického poznání chování substituovaných HA molekul a jejich interakcí v různých prostředích přináší tato práce i poznatky, užitečné pro samotné MD simulace. Vzhledem k tomu, že doposud nebyly realizovány simulace řetězců, které by byly takto specificky substituované, ani jiné simulace větších molekul ve směsných rozpouštědlech, je možné říci, že tato práce pomohla posunout hranice a možnosti molekulárně dynamického modelování.

8. Závěr

V teoretické části práce byl vysvětlen význam kyseliny hyaluronové v živých organismech a také její velké praktické využití. Byly zde rozepsány některé metody, jimiž se provádí její modifikace a také směsná organická rozpouštědla, v jejichž prostředí se tyto modifikace provádí. Dále bylo stručně popsáno, jak funguje molekulová dynamika a s pomocí jakých softwarů je ji možné realizovat.

V experimentální části byly pomocí molekulárně dynamických simulací detailně prozkoumány interakce hyaluronanových řetězců v čisté vodě a ve směsných rozpouštědlech voda:dioxan a voda:terc-butanol. Zkoumána byla dynamika HA a HA řetězců, substituovaných alifatickými zbytky s 18 uhlíky, ale také vzájemná interakce dvojic substituovaných i nesubstituovaných řetězců.

Všechny získané výsledky potvrzují, že jsou řetězce HA (bez ohledu na to, zda jsou substituované nebo nesubstituované) velmi silně ovlivněny volbou použitého rozpouštědla. Závisí na něm jejich ohebnost, konformace, ale i míra vzájemné interakce, a to jak substituentů, tak HA páteře. Zatímco v případě čisté vody spolu řetězce téměř neinteragovaly, a to ani po přidání sodné soli, která snížila náboj na jednotlivých HA řetězcích, při přidání organické složky už byly interakce mezi HA řetězci častější.

Největší míru interakce a ohebnosti vykazovaly HA řetězce ve směsích vody a dioxanu. U nesubstituovaných řetězců zde dokonce došlo k formaci dvoušroubovice, stabilizované iontovými mosty a vodíkovými vazbami. U substituovaných pak bylo možné pozorovat zvýšenou ohebnost a její důsledky (např. v podobě interagujících substituentů na opačných koncích HA řetězce).

Ve směsích vody a terc-butanolu spolu řetězce interagovaly méně než za přítomnosti dioxanu, ale více než ve vodě. Mikrodoménová struktura tohoto směsného rozpouštědla měla na chování řetězců velký vliv a projevila se zejména v blízkosti substituovaných řetězců, kde organická složka zcela obklopila substituenty a vodní složka (spolu s ionty) pak HA páteř. Tím bylo substituentům znemožněno interagovat jak mezi sebou, tak s HA páteří.

Na chování řetězců i jejich případnou interakci měla velký vliv také přítomnost NaCl v roztoku. Zatímco v čisté vodě interakce řetězců s koncentrací soli rostla, až dosáhla maxima kolem 0.6 M NaCl, ve směsných rozpouštědlech byl hlavně vidět rozdíl mezi její přítomností a nepřítomností. V systémech, které byly pouze neutralizované (nacházelo se v nich jen tolik sodných iontů, aby byl výsledný náboj systému nulový) docházelo k interakcím jen minimálně. Řetězce byly zpevňované

intramolekulárními vodíkovými vazbami a vazbami na vodu v nejbližším okolí. Přítomnost sodných iontů tyto vazby rozrušovala a místo nich tak mohlo docházet k ohybům řetězců, rotacím dihedrálních úhlů či k tvorbě intermolekulárních vazeb.

Vliv substituentů na chování HA řetězců byl komplexní. Jejich umístěním byla výrazně ovlivněna distribuce rozpouštědla v okolí modifikovaných HA molekul a naopak (zejména ve směsích s terc-butanolem). Dva hlavní vlivy na dynamiku substituovaných HA řetězců představovaly právě substituenty (a jejich hydrofobní interakce) a potom také rigidita HA páteře. Hydrofobní interakce, kterou se alifatické řetězce vzájemně přitahovaly, měla poměrně krátký dosah, takže její vliv bylo možné pozorovat jen pokud se substituenty dostatečně přiblížily. K tomu docházelo zejména u ohebných řetězců (např. HA ve směsi voda:dioxan za přítomnosti NaCl) nebo v případě interakcí dvou substituovaných HA molekul. Pokud však byla HA páteř vlivem okolního prostředí (a nedostatku Na⁺ iontů) málo ohebná, přítomnost substituentů na ni neměla téměř žádný vliv.

I mezi dvojicí substituovaných HA řetězců docházelo (zejména ve směsných rozpouštědlech a za přítomnosti soli) k tvorbě vazeb a krátkodobých duplexních struktur. Rozdíl mezi interakcí nesubstituovaných a substituovaných řetězců spočíval převážně v jejich vzdálenosti. Nesubstituované řetězce se dostaly o 10–15 Å blíž k sobě, čímž se mezi nimi mohlo tvořit více vodíkových i jiných vazeb. Počet iontových mostů byl ale mezi oběma typy řetězců dost podobný. Přestože se substituované řetězce zdržovaly dál od sebe, jejich ohebnost byla o něco větší – je tak možné očekávat, že v experimentálních podmínkách by se substituované HA řetězce ve směsných rozpouštědlech zaplétaly spíše fyzikálně než chemicky, nebo by se minimálně zaplétaly o něco více než řetězce nesubstituované.

Celá práce přispěla k lepšímu pochopení chování krátkých hyaluronanových řetězců (substituovaných i nesubstituovaných) a poznatky, získané tímto výzkumem, mohou být aplikovány v oblasti materiálového inženýrství nebo při využití modifikovaného hyaluronanu ve farmacii.

Reference

- [1] A. Cadete, A. Olivera, M. Besev, P.K. Dhal, L. Gonçalves, A.J. Almeida, G. Bastiat, J.P. Benoit, M. de la Fuente, M. Garcia-Fuentes, M.J. Alonso, D. Torres, Self-assembled hyaluronan nanocapsules for the intracellular delivery of anticancer drugs, *Scientific Reports* 2019 9:1 9 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47995-8>.
- [2] G. Huang, H. Huang, Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery, *Drug Deliv* 25 (2018) 766–772. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1450910>.
- [3] G. Huerta-Angeles, M. Bobek, E. Příkopová, D. Šmejkalová, V. Velebný, Novel synthetic method for the preparation of amphiphilic hyaluronan by means of aliphatic aromatic anhydrides, *Carbohydr Polym* 111 (2014) 883–891. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.05.035>.
- [4] M. Juhaščík, K. Štarmanová, M. Brandejsová, P. Večeřová, M. Hermannová, A. Exnerová, H. Vagnerová, O. Štrympl, K. Nešporová, A. Kováčik, V. Velebný, G. Huerta-Ángeles, Synthesis and self-assembling of hyaluronan grafted with ceramide NP for topical drug delivery, *Carbohydr Polym* 321 (2023) 121283. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2023.121283>.
- [5] G. Huerta-Ángeles, F. Ondreáš, M. Brandejsová, K. Kopecká, H. Vagnerová, J. Kulhánek, T. Drmota, Formulation of hyaluronan grafted with dodecanoic acid as a potential ophthalmic treatment, *Carbohydr Polym* 246 (2020) 116578. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116578>.
- [6] E. Kutálková, J. Hrnčířík, R. Witasek, M. Ingr, G. Huerta-Ángeles, M. Hermannová, V. Velebný, The rate and evenness of the substitutions on hyaluronan grafted by dodecanoic acid influenced by the mixed-solvent composition, *Int J Biol Macromol* 189 (2021) 826–836. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.137>.
- [7] K. Meyer, J.W. Palmer, The polysaccharide of the vitreous humor, *Journal of Biological Chemistry* 107 (1934) 629–634. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75338-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75338-6).
- [8] K. Meyer, The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase, *Physiol Rev* 27 (1947) 335–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.1947.27.3.335>.
- [9] A.G. Ogston, J.E. Stanier, On the state of hyaluronic acid in synovial fluid, *Biochemical Journal* 46 (1950) 364–376. <https://doi.org/10.1042/bj0460364>.
- [10] K. Meyer, G.L. Hobby, E. Chaffee, M.H. Dawson, The hydrolysis of hyaluronic acid by bacterial enzymes, *Journal of Experimental Medicine* 71 (1940) 137–146. <https://doi.org/10.1084/jem.71.2.137>.
- [11] Z. Hadidian, N.W. Pirie, The preparation and some properties of hyaluronic acid from human umbilical cord, *Biochemical Journal* 42 (1948) 260–265. <https://doi.org/10.1042/bj0420260>.

- [12] M. Inoue, C. Katakami, The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (1993) 2313–2315. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161035> (accessed December 5, 2023).
- [13] T. Nishida, M. Nakamura, H. Mishima, T. Otori, Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration, *Exp Eye Res* 53 (1991) 753–758. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(91\)90110-Z](https://doi.org/10.1016/0014-4835(91)90110-Z).
- [14] H. Bothner, O. Wik, Rheology of Hyaluronate, *Acta Otolaryngol* 104 (1987) 25–30. <https://doi.org/10.3109/00016488709102834>.
- [15] A.G. Ogston, J.E. Stanier, The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties, *J Physiol* 119 (1953) 244. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1953.SP004842>.
- [16] B.P. Toole, Glycosaminoglycans in Morphogenesis, *Cell Biology of Extracellular Matrix* (1981) 259–294. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0881-2_10.
- [17] J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *J Intern Med* 242 (1997) 27–33. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2796.1997.00170.X>.
- [18] R.W. Quinn, K.P. Singh, Antigenicity of Hyaluronic Acid., *Exp Biol Med* 95 (1957) 290–294. <https://doi.org/10.3181/00379727-95-23197>.
- [19] L. Lapčák, L. Lapčák, S. De Smedt, J. Demeester, P. Chabreček, Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications, *Chem Rev* 98 (1998). <https://doi.org/10.1021/CR941199Z>.
- [20] J.E. Scott, F. Heatley, Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy, *Biomacromolecules* 3 (2002) 547–553. <https://doi.org/10.1021/BM010170J/ASSET/IMAGES/LARGE/BM010170JF00005.JPEG>.
- [21] Hascall, T.C. Laurent, Hyaluronan:Structure and physical properties, *Glycoforum* 1 (1997).
- [22] P. Gribbon, B.C. Heng, T.E. Hardingham, The molecular basis of the solution properties of hyaluronan investigated by confocal fluorescence recovery after photobleaching, *Biophys J* 77 (1999) 2210–2216. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77061-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77061-X).
- [23] J.K. Sheehan, E.D.T. Atkins, X-ray fibre diffraction study of conformational changes in hyaluronate induced in the presence of sodium, potassium and calcium cations, *Int J Biol Macromol* 5 (1983) 215–221. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(83\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0141-8130(83)90005-3).
- [24] T. Takamiku, A. Nakamizo, M. Tabata, K. Yoshida, T. Yamaguchi, T. Otomo, Large-angle X-ray scattering, small-angle neutron scattering, and NMR relaxation studies on mixing states of 1,4-dioxane-water, 1,3-dioxane-water, and tetrahydrofuran-water mixtures, *J Mol Liq* 103–104 (2003) 143–159. [https://doi.org/10.1016/S0167-7322\(02\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7322(02)00133-2).
- [25] J.E. Scott, F. Heatley, Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ¹³C NMR study, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 4850–4855.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.96.9.4850/ASSET/9803COB9-20F5-4DF3-9EAC-1A9DF616960E/ASSETS/GRAPHIC/PQ0990788006.JPEG>.

- [26] E. Fischer, P.T. Callaghan, F. Heatley, J.E. Scott, Shear flow affects secondary and tertiary structures in hyaluronan solution as shown by rheo-NMR, *J Mol Struct* 602–603 (2002) 303–311. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00733-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00733-5).
- [27] V. Gargiulo, M.A. Morando, A. Silipo, A. Nurisso, S. Pérez, A. Imberty, F.J. Cañada, M. Parrilli, J. Jiménez-Barbero, C. De Castro, Insights on the conformational properties of hyaluronic acid by using NMR residual dipolar couplings and MD simulations, *Glycobiology* 20 (2010) 1208–1216. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWQ067>.
- [28] J. Chmelař, A. Kotzianová, M. Hermannová, R. Šuláková, D. Šmejkalová, J. Kulhánek, V. Velebný, Evaluating the degree of substitution of water-insoluble acyl derivatives of hyaluronan using Raman spectroscopy: method development and comparison with gas chromatography and ¹H NMR, *Analytical Methods* 9 (2017) 232–239. <https://doi.org/10.1039/C6AY03067J>.
- [29] A. Almond, J.K. Sheehan, A. Brass, Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution, *Glycobiology* 7 (1997) 597–604. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/7.5.597>.
- [30] O. Guvench, Atomic-Resolution Experimental Structural Biology and Molecular Dynamics Simulations of Hyaluronan and Its Complexes, *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 7276 27 (2022) 7276. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217276>.
- [31] S.M.A. Holmbeck, P.A. Petillo, L.E. Lerner, The solution conformation of hyaluronan: A combined NMR and molecular dynamics study, *Biochemistry* 33 (1994) 14246–14255. <https://doi.org/10.1021/bi00251a037>.
- [32] G. Giubertoni, G.H. Koenderink, H.J. Bakker, Direct Observation of Intrachain Hydrogen Bonds in Aqueous Hyaluronan, *J Phys Chem A* 123 (2019) 8220–8225. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b06462>.
- [33] C.D. Blundell, P.L. DeAngelis, A. Almond, Hyaluronan: the absence of amide–carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models, *Biochemical Journal* 396 (2006) 487–498. <https://doi.org/10.1042/BJ20060085>.
- [34] B. Wirostko, B.K. Mann, D.L. Williams, G.D. Prestwich, Ophthalmic Uses of a Thiol-Modified Hyaluronan-Based Hydrogel, *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3 (2014) 708–716. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2014.0572>.
- [35] M.H. Asim, S. Silberhumer, I. Shahzadi, A. Jalil, B. Matuszczak, A. Bernkop-Schnürch, S-protected thiolated hyaluronic acid: In-situ crosslinking hydrogels for 3D cell culture scaffold, *Carbohydr Polym* 237 (2020) 116092. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116092>.
- [36] N. El Kechai, E. Mamelle, Y. Nguyen, N. Huang, V. Nicolas, P. Chaminade, S. Yen-Nicolaÿ, C. Gueutin, B. Granger, E. Ferrary, F. Agnely, A. Bochot, Hyaluronic acid liposomal gel sustains

- delivery of a corticoid to the inner ear, *Journal of Controlled Release* 226 (2016) 248–257.
<https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.02.013>.
- [37] M. Manconi, M.L. Manca, D. Valenti, E. Escibano, H. Hillaireau, A.M. Fadda, E. Fattal, Chitosan and hyaluronan coated liposomes for pulmonary administration of curcumin, *Int J Pharm* 525 (2017) 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.04.044>.
- [38] N.K. Han, D.H. Shin, J.S. Kim, K.Y. Weon, C.Y. Jang, J.S. Kim, Hyaluronan-conjugated liposomes encapsulating gemcitabine for breast cancer stem cells, *Int J Nanomedicine* 11 (2016) 1413–1425. <https://doi.org/10.2147/IJN.S95850>.
- [39] H. Kim, H.T. Park, Y.M. Tae, W.H. Kong, D.K. Sung, B.W. Hwang, K.S. Kim, Y.K. Kim, S.K. Hahn, Bioimaging and pulmonary applications of self-assembled Flt1 peptide–hyaluronic acid conjugate nanoparticles, *Biomaterials* 34 (2013) 8478–8490.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.07.062>.
- [40] A.H. Pandit, N. Mazumdar, S. Ahmad, Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications, *Int J Biol Macromol* 137 (2019) 853–869.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.014>.
- [41] J.R. Glass, K.T. Dickerson, K. Stecker, J.W. Polarek, Characterization of a hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix, *Biomaterials* 17 (1996) 1101–1108.
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85911-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85911-4).
- [42] L. Musilová, A. Mráček, A. Kovalcik, P. Smolka, A. Minařík, P. Humpolíček, R. Vícha, P. Ponížil, Hyaluronan hydrogels modified by glycinated Kraft lignin: Morphology, swelling, viscoelastic properties and biocompatibility, *Carbohydr Polym* 181 (2018) 394–403.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.10.048>.
- [43] O. Štrympl, J. Vohlídal, M. Hermannová, M. Maldonado-Domínguez, M. Brandejsová, K. Kopecká, V. Velebný, G. Huerta-Ángeles, Oleate-modified hyaluronan: Controlling the number and distribution of side chains by varying the reaction conditions, *Carbohydr Polym* 267 (2021) 118197. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118197>.
- [44] P. Walvekar, R. Gannimani, M. Salih, S. Makhathini, C. Mocktar, T. Govender, Self-assembled oleylamine grafted hyaluronic acid polymersomes for delivery of vancomycin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Colloids Surf B Biointerfaces* 182 (2019) 110388. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2019.110388>.
- [45] G. Huerta-Ángeles, M. Brandejsová, P. Štěpán, V. Pavlík, J. Starigazdová, P. Orzol, K. Kopecká, P. Halamková, J. Kulhánek, V. Velebný, Retinoic acid grafted to hyaluronan for skin delivery: Synthesis, stability studies, and biological evaluation, *Carbohydr Polym* 231 (2020) 115733. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115733>.
- [46] I. Bakulin, N. Kondratyuk, A. Lankin, G. Norman, Properties of aqueous 1,4-dioxane solution via molecular dynamics, *Journal of Chemical Physics* 155 (2021).
<https://doi.org/10.1063/5.0059337/199777>.

- [47] S.D. Overduin, A. Perera, G.N. Patey, Structural behavior of aqueous t-butanol solutions from large-scale molecular dynamics simulations, *Journal of Chemical Physics* 150 (2019). <https://doi.org/10.1063/1.5097011/198791>.
- [48] S. Kaur, H.K. Kashyap, Three-dimensional Morphology and X-ray Scattering Structure of Aqueous tert-Butanol Mixtures: A Molecular Dynamics Study, *Journal of Chemical Sciences* 129 (2017) 103–116. <https://doi.org/10.1007/S12039-016-1207-9/FIGURES/9>.
- [49] P.A. Levene, J. López-Suárez, MUCINS AND MUCOIDS, *Journal of Biological Chemistry* 36 (1918) 105–126. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86425-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86425-0).
- [50] F.E. Kendall, M. Heidelberger, M.H. Dawson, A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus, *Journal of Biological Chemistry* 118 (1937) 61–69.
- [51] M.A. Selyanin, P.YA. Boykov, V.N. Khabarov, The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use, in: F. Polyak (Ed.), *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine*, John Wiley & Sons, 2015: pp. 1–8.
- [52] S. Yung, G.J. Thomas, M. Davies, Induction of hyaluronan metabolism after mechanical injury of human peritoneal mesothelial cells in vitro, *Kidney Int* 58 (2000) 1953–1962. <https://doi.org/10.1111/J.1523-1755.2000.00367.X>.
- [53] L. Robert, A.M. Robert, G. Renard, Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging, *Pathologie Biologie* 58 (2010) 187–198. <https://doi.org/10.1016/J.PATBIO.2009.09.010>.
- [54] T. SUGIYAMA, S. MIYAUCHI, A. MACHIDA, K. MIYAZAKI, K. TOKUYASU, K. NAKAZAWA, The Effect of Sodium Hyaluronate on the Migration of Rabbit Corneal Epithelium. II. The Effect of Topical Administration, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 7 (1991) 53–64. <https://doi.org/10.1089/jop.1991.7.53>.
- [55] J.G. Hollyfield, M.E. Rayborn, R. Tammi, Hyaluronan Localization in Tissues of the Mouse Posterior Eye Wall: Absence in the Interphotoreceptor Matrix, *Exp Eye Res* 65 (1997) 603–608. <https://doi.org/10.1006/EXER.1997.0369>.
- [56] P.E. Peterson, C.S.T. Pow, D.B. Wilson, A.G. Hendrickx, Localisation of glycoproteins and glycosaminoglycans during early eye development in the macaque, *J Anat* 186 (1995) 31–42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7649817/> (accessed December 5, 2023).
- [57] B.A. Bray, The Role of Hyaluronan in the Pulmonary Alveolus, *J Theor Biol* 210 (2001) 121–130. <https://doi.org/10.1006/JTBI.2001.2305>.
- [58] P. Teder, O. Nettelbladt, P. Heldin, Characterization of the mechanism involved in bleomycin-induced increased hyaluronan production in rat lung., *Am J Respir Cell Mol Biol* 12 (1995) 181–189. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.12.2.7532420>.

- [59] A. Peters, L.S. Sherman, Diverse Roles for Hyaluronan and Hyaluronan Receptors in the Developing and Adult Nervous System, *Int J Mol Sci* 21 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21175988>.
- [60] A.A. Fouladi-Nashta, K.A. Raheem, W.F. Marei, F. Ghafari, G.M. Hartshorne, Regulation and roles of the hyaluronan system in mammalian reproduction, *Reproduction* 153 (2017) R43–R58. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0240>.
- [61] G. Jensen, J.L. Holloway, S.E. Stabenfeldt, Hyaluronic Acid Biomaterials for Central Nervous System Regenerative Medicine, *Cells* 9 (2020) 2113. <https://doi.org/10.3390/cells9092113>.
- [62] R. Servaty, J. Schiller, H. Binder, K. Arnold, Hydration of polymeric components of cartilage — an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate, *Int J Biol Macromol* 28 (2001) 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00161-6).
- [63] K. Brandt, Modification of chemotaxis by synovial fluid hyaluronate, *Arthritis Rheum* 13 (1970) 308–309.
- [64] T.M. Tamer, Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing, *Interdiscip Toxicol* 6 (2013) 111. <https://doi.org/10.2478/INTOX-2013-0019>.
- [65] D. Mazzucco, R. Scott, M. Spector, Composition of joint fluid in patients undergoing total knee replacement and revision arthroplasty: correlation with flow properties, *Biomaterials* 25 (2004) 4433–4445. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.11.023>.
- [66] J.H. Chung, P. Fagerholm, B. Lindström, Hyaluronate in healing of corneal alkali wound in the rabbit, *Exp Eye Res* 48 (1989) 569–576. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(89\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0014-4835(89)90039-0).
- [67] G. Camillieri, C. Bucolo, S. Rossi, F. Drago, Hyaluronan-Induced Stimulation of Corneal Wound Healing is a Pure Pharmacological Effect, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 20 (2004) 548–553. <https://doi.org/10.1089/jop.2004.20.548>.
- [68] A. Koralewska-Makár, Y. Sommarin, A. Bruun, N. Molander, U. Stenevi, B. Ehinger, Synthesis of hyaluronan by normal and wounded rabbit iris, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 238 (2000) 520–524. <https://doi.org/10.1007/PL00007894>.
- [69] W. Knudson, Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion., *Am J Pathol* 148 (1996) 1721–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8669457> (accessed December 5, 2023).
- [70] B. Gerdin, R. Hällgren, Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation, *J Intern Med* 242 (1997) 49–55. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2796.1997.00173.X>.
- [71] A. Jong, C.H. Wu, H.M. Chen, F. Luo, K.J. Kwon-Chung, Y.C. Chang, C.W. LaMunyon, A. Plaas, S.H. Huang, Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection, *Eukaryot Cell* 6 (2007) 1486–1496. <https://doi.org/10.1128/EC.00120-07>.

- [72] L.M. Blank, P. Hugenholtz, L.K. Nielsen, Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci, *J Mol Evol* 67 (2008) 13–22. <https://doi.org/10.1007/S00239-008-9117-1>.
- [73] P.L. DeAngelis, W. Jing, R.R. Drake, A.M. Achyuthan, Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 8454–8458. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.8454>.
- [74] L.J. Chien, C.K. Lee, Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin, *Biotechnol Prog* 23 (2007) 1017–1022. <https://doi.org/10.1021/BP070036W>.
- [75] L. Liu, M. Wang, G. Du, J. Chen, Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy, *Lett Appl Microbiol* 46 (2008) 383–388. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2008.02325.X>.
- [76] B.F. Chong, L.K. Nielsen, Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*, *J Biotechnol* 100 (2003) 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00239-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00239-0).
- [77] J. Krahulec, J. Krahulcová, Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain deficient in beta-glucuronidase in laboratory conditions, *Appl Microbiol Biotechnol* 71 (2006) 415–422. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0173-9>.
- [78] B. Widner, R. Behr, S. Von Dollen, M. Tang, T. Heu, A. Sloma, D. Sternberg, P.L. Deangelis, P.H. Weigel, S. Brown, Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*, *Appl Environ Microbiol* 71 (2005) 3747–3752. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005>.
- [79] L.J. Chien, C.K. Lee, Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*, *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (2007) 339–346. <https://doi.org/10.1007/S00253-007-1153-Z>.
- [80] H. Yu, G. Stephanopoulos, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid, *Metab Eng* 10 (2008) 24–32. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2007.09.001>.
- [81] L. Liu, Y. Liu, J. Li, G. Du, J. Chen, Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives, *Microb Cell Fact* 10 (2011). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-99>.
- [82] W.Y. Chen, E. Marcellin, J. Hung, L.K. Nielsen, Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*, *J Biol Chem* 284 (2009) 18007–18014. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.011999>.
- [83] J.Z. Sheng, P.X. Ling, X.Q. Zhu, X.P. Guo, T.M. Zhang, Y.L. He, F.S. Wang, Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer, *J Appl Microbiol* 107 (2009) 136–144. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2009.04185.X>.

- [84] H. Knopf-Marques, M. Pravda, L. Wolfova, V. Velebny, P. Schaaf, N.E. Vrana, P. Lavallo, Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation, *Adv Healthc Mater* 5 (2016) 2841–2855. <https://doi.org/10.1002/ADHM.201600316>.
- [85] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Vet Med (Praha)* 53 (2008) 397–411.
- [86] E.A. Balazs, T.C. Laurent, R.W. Jeanloz, Nomenclature of hyaluronic acid, *Biochem J* 235 (1986) 903. <https://doi.org/10.1042/BJ2350903>.
- [87] E.R. Morris, D.A. Rees, E.J. Welsh, Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions, *J Mol Biol* 138 (1980) 383–400. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90294-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90294-6).
- [88] M. Dovedytis, Z.J. Liu, S. Bartlett, Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review, *Engineered Regeneration* 1 (2020) 102–113. <https://doi.org/10.1016/J.ENGREG.2020.10.001>.
- [89] R. Egbu, S. Brocchini, P.T. Khaw, S. Awwad, Antibody loaded collapsible hyaluronic acid hydrogels for intraocular delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 124 (2018) 95–103. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2017.12.019>.
- [90] H. Cao, Z. Li, Y. Chen, J. Zhu, M. Chen, H. Lei, Y. Xiao, J. Liang, T. Yuan, Y. Sun, Y. Fan, X. Zhang, Viscoelasticity microenvironment constructed by self-crosslinking hyaluronan hybrid hydrogels regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Compos B Eng* 263 (2023) 110871. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2023.110871>.
- [91] L. Vítková, L. Musilová, E. Achbergerová, R. Kolařík, M. Mrlík, K. Korpasová, L. Mahelová, Z. Capáková, A. Mráček, Formulation of Magneto-Responsive Hydrogels from Dually Cross-Linked Polysaccharides: Synthesis, Tuning and Evaluation of Rheological Properties, *Int J Mol Sci* 23 (2022) 9633. <https://doi.org/10.3390/ijms23179633>.
- [92] A. Kolaříková, E. Kutálková, V. Buš, R. Witasek, J. Hrnčířík, M. Ingr, Salt-dependent intermolecular interactions of hyaluronan molecules mediate the formation of temporary duplex structures, *Carbohydr Polym* 286 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119288>.
- [93] J.K. Sheehan, K.H. Gardner, E.D.T. Atkins, Hyaluronic acid: a double-helical structure in the presence of potassium at low pH and found also with the cations ammonium, rubidium and caesium, *J Mol Biol* 117 (1977) 113–135. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90027-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90027-4).
- [94] I.C.M. Dea, R. Moorhouse, D.A. Rees, S. Arnott, J.M. Guss, E.A. Balazs, Hyaluronic Acid: A Novel, Double Helical Molecule, *Science* (1979) 179 (1973) 560–562. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.179.4073.560>.
- [95] S. Arnott, A.K. Mitra, S. Raghunathan, Hyaluronic acid double helix, *J Mol Biol* 169 (1983) 861–872. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80140-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80140-5).
- [96] J.E. Scott, C. Cummings, A. Brass, Y. Chen, Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer

simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer, *Biochemical Journal* 274 (1991) 699–705. <https://doi.org/10.1042/bj2740699>.

- [97] M.K. Cowman, M. Li, E.A. Balazs, Tapping Mode Atomic Force Microscopy of Hyaluronan: Extended and Intramolecularly Interacting Chains, *Biophys J* 75 (1998) 2030–2037. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77645-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77645-3).
- [98] P. GRIBBON, B.C. HENG, T.E. HARDINGHAM, The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain–chain association, *Biochemical Journal* 350 (2000) 329. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3500329>.
- [99] N.R. Yaffe, A. Almond, E.W. Blanch, A new route to carbohydrate secondary and tertiary structure using Raman spectroscopy and Raman optical activity, *J Am Chem Soc* 132 (2010) 10654–10655. https://doi.org/10.1021/JA104077N/ASSET/IMAGES/LARGE/JA-2010-04077N_0002.JPEG.
- [100] G. Giubertoni, F. Burla, C. Martinez-Torres, B. Dutta, G. Pletikapic, E. Pelan, Y.L.A. Rezus, G.H. Koenderink, H.J. Bakker, Molecular Origin of the Elastic State of Aqueous Hyaluronic Acid, *Journal of Physical Chemistry B* 123 (2019) 3043–3049. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.9B00982/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2019-00982F_0006.JPEG.
- [101] T.C. Laurent, J. Gergely, Light scattering studies on hyaluronic acid, *Journal of Biological Chemistry* 212 (1955) 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71119-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71119-8).
- [102] R. Mendichi, A.G. Schieroni, C. Grassi, A. Re, Characterization of ultra-high molar mass hyaluronan: 1. Off-line static methods, *Polymer (Guildf)* 39 (1998) 6611–6620. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00167-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00167-0).
- [103] F. Heatley, J.E. Scott, A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan, *Biochemical Journal* 254 (1988) 489–493. <https://doi.org/10.1042/bj2540489>.
- [104] J.D. Kahmann, R. O’Brien, J.M. Werner, D. Heinegård, J.E. Ladbury, I.D. Campbell, A.J. Day, Localization and characterization of the hyaluronan-binding site on the Link module from human TSG-6, *Structure* 8 (2000) 763–774. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00163-5).
- [105] C.L. Hawkins, M.J. Davies, Degradation of Hyaluronic Acid, Poly- and Mono-Saccharides, and Model Compounds by Hypochlorite: Evidence for Radical Intermediates and Fragmentation, *Free Radic Biol Med* 24 (1998) 1396–1410. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00009-4).
- [106] C.L. Hawkins, M.J. Davies, Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials, *Free Radic Biol Med* 21 (1996) 275–290. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00042-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00042-1).
- [107] C. Ke, L. Sun, D. Qiao, D. Wang, X. Zeng, Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid, *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 2670–2675. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.07.020>.

- [108] R. Moseley, M. Leaver, M. Walker, R.J. Waddington, D. Parsons, W.Y.J. Chen, G. Embery, Comparison of the antioxidant properties of HYAFF-11p75, AQUACEL and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro, *Biomaterials* 23 (2002) 2255–2264. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00360-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00360-X).
- [109] J.K. Kim, P. Srinivasan, J.H. Kim, J. il Choi, H.J. Park, M.W. Byun, J.W. Lee, Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid, *Food Chem* 109 (2008) 763–770. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.01.038>.
- [110] T. Hardingham, *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Chapter 1: Solution Properties of Hyaluronan, Elsevier Science, 2004. <https://www.wiley.com/en-us/Hyaluronic+Acid%3A+Production%2C+Properties%2C+Application+in+Biology+and+Medicine-p-9781118633793> (accessed December 22, 2023).
- [111] R.E. Turner, P. Lin, M.K. Cowman, Self-association of hyaluronate segments in aqueous NaCl solution, *Arch Biochem Biophys* 265 (1988) 484–495. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90153-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90153-1).
- [112] P. Matteini, L. Dei, E. Carretti, N. Volpi, A. Goti, R. Pini, Structural behavior of highly concentrated hyaluronan, *Biomacromolecules* 10 (2009) 1516–1522. https://doi.org/10.1021/BM900108Z/ASSET/IMAGES/LARGE/BM-2009-00108Z_0011.JPEG.
- [113] H. Yamakawa, M. Fujii, H. Stockmayer, *Statistical Mechanics of Chian Molecules*, Reel. Trau. Chim 68 (1974) 5. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (accessed December 29, 2023).
- [114] H. Yamakawa, T. Yoshizaki, Transport Coefficients of Helical Wormlike Chains. 3. Intrinsic Viscosity, *Macromolecules* 13 (1980) 633–643. <https://doi.org/10.1021/ma60075a029>.
- [115] H. Yamakawa, W.H. Stockmayer, *Statistical Mechanics of Wormlike Chains*. II. Excluded Volume Effects, *J Chem Phys* 57 (1972) 2843–2854. <https://doi.org/10.1063/1.1678675>.
- [116] J. Shimada, H. Yamakawa, *Statistical mechanics of helical worm-like chains*. XV. Excluded-volume effects, *J Chem Phys* 85 (1986) 591–600. <https://doi.org/10.1063/1.451853>.
- [117] H. Yamakawa, J. Shimada, Stiffness and excluded-volume effects in polymer chains, *J Chem Phys* 83 (1985) 2607–2611. <https://doi.org/10.1063/1.449254>.
- [118] E. Fouissac, M. Milas, M. Rinaudo, R. Borsali, Influence of the Ionic Strength on the Dimensions of Sodium Hyaluronate, *Macromolecules* 25 (1992) 5613–5617. https://doi.org/10.1021/MA00047A009/ASSET/MA00047A009.FP.PNG_V03.
- [119] R. Mendichi, L. Šoltés, A. Giacometti Schieron, Evaluation of radius of gyration and intrinsic viscosity molar mass dependence and stiffness of hyaluronan, *Biomacromolecules* 4 (2003) 1805–1810. <https://doi.org/10.1021/BM0342178/ASSET/IMAGES/LARGE/BM0342178F00008.JPEG>.
- [120] E. Kutáľková, J. Hrnčířík, R. Witasek, M. Ingr, Effect of solvent and ions on the structure and dynamics of a hyaluronan molecule, *Carbohydr Polym* 234 (2020) 115919. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.115919>.

- [121] A.S. Krishna, C. Radhakumary, K. Sreenivasan, Calcium ion modulates protein release from chitosan-hyaluronic acid poly electrolyte gel, *Polym Eng Sci* 55 (2015) 2089–2097. <https://doi.org/10.1002/PEN.24050>.
- [122] E.N. Bowman, J.D. Hallock, T.W. Throckmorton, F.M. Azar, Hyaluronic acid injections for osteoarthritis of the knee: predictors of successful treatment, *Int Orthop* 42 (2018) 733–740. <https://doi.org/10.1007/S00264-017-3731-8/FIGURES/4>.
- [123] L.J. Kang, J. Yoon, J.G. Rho, H.S. Han, S. Lee, Y.S. Oh, H. Kim, E. Kim, S.J. Kim, Y.T. Lim, J.H. Park, W.K. Song, S. Yang, W. Kim, Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for osteoarthritis treatment, *Biomaterials* 275 (2021) 120967. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2021.120967>.
- [124] N. Yerushalmi, A. Arad, R. Margalit, Molecular and Cellular Studies of Hyaluronic Acid-Modified Liposomes as Bioadhesive Carriers for Topical Drug Delivery in Wound Healing, *Arch Biochem Biophys* 313 (1994) 267–273. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1387>.
- [125] S. Hauck, P. Zager, N. Halfter, E. Wandel, M. Torregrossa, A. Kakpenova, S. Rother, M. Ordieres, S. Räthel, A. Berg, S. Möller, M. Schnabelrauch, J.C. Simon, V. Hintze, S. Franz, Collagen/hyaluronan based hydrogels releasing sulfated hyaluronan improve dermal wound healing in diabetic mice via reducing inflammatory macrophage activity, *Bioact Mater* 6 (2021) 4342–4359. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.04.026>.
- [126] L. Koivusalo, J. Karvinen, E. Sorsa, I. Jönkkäri, J. Väliäho, P. Kallio, T. Ilmarinen, S. Miettinen, H. Skottman, M. Kellomäki, Hydrazone crosslinked hyaluronan-based hydrogels for therapeutic delivery of adipose stem cells to treat corneal defects, *Materials Science and Engineering: C* 85 (2018) 68–78. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.12.013>.
- [127] R. Egbu, S. Brocchini, P.T. Khaw, S. Awwad, Antibody loaded collapsible hyaluronic acid hydrogels for intraocular delivery, *Eur J Pharm Biopharm* 124 (2018) 95–103. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2017.12.019>.
- [128] K. Kaur, H. Singh, M. Singh, Repair of tympanic membrane perforation by topical application of 1% sodium hyaluronate, *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* 58 (2006) 241. <https://doi.org/10.1007/BF03050829>.
- [129] J.S. Kroin, R. Kc, X. Li, J.L. Hamilton, V. Das, A.J. van Wijnen, O.M. Dall, D.A. Shelly, T. Kenworth, H.J. Im, Intraarticular slow-release triamcinolone acetate reduces allodynia in an experimental mouse knee osteoarthritis model, *Gene* 591 (2016) 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2016.06.049>.
- [130] Y.H. Liao, S.A. Jones, B. Forbes, G.P. Martin, M.B. Brown, Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery, *Drug Deliv* 12 (2005) 327–342. <https://doi.org/10.1080/10717540590952555>.
- [131] T. Neumayer, A. Prinz, O. Findl, Effect of a new cohesive ophthalmic viscosurgical device on corneal protection and intraocular pressure in small-incision cataract surgery, *J Cataract Refract Surg* 34 (2008) 1362–1366. <https://doi.org/10.1016/J.JCRS.2008.04.018>.

- [132] R. Gurny, H. Ibrahim, A. Aebi, P. Buri, C.G. Wilson, N. Washington, P. Edman, O. Camber, Design and evaluation of controlled release systems for the eye, *Journal of Controlled Release* 6 (1987) 367–373. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90090-3).
- [133] A. Ludwig, M. Van Ooteghem, Evaluation of sodium hyaluronate as viscous vehicle for eye drops., *J Pharm Belg* 44 (1989) 391–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2632760> (accessed December 19, 2023).
- [134] M.A. Moustafa, Y.S.R. Elnaggar, W.M. El-Refaie, O.Y. Abdallah, Hyalugel-integrated liposomes as a novel ocular nanosized delivery system of fluconazole with promising prolonged effect, *Int J Pharm* 534 (2017) 14–24. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.10.007>.
- [135] K.Y. Choi, K.H. Min, H.Y. Yoon, K. Kim, J.H. Park, I.C. Kwon, K. Choi, S.Y. Jeong, PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo, *Biomaterials* 32 (2011) 1880–1889. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.11.010>.
- [136] X. Tian, J. Azpurua, C. Hine, A. Vaidya, M. Myakishev-Rempel, J. Ablueva, Z. Mao, E. Nevo, V. Gorbunova, A. Seluanov, High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat, *Nature* 499 (2013) 346–349. <https://doi.org/10.1038/NATURE12234>.
- [137] K.S. Rankin, D. Frankel, Hyaluronan in cancer – from the naked mole rat to nanoparticle therapy, *Soft Matter* 12 (2016) 3841–3848. <https://doi.org/10.1039/C6SM00513F>.
- [138] Y. Zhao, S. Qiao, X. Hou, H. Tian, S. Deng, K. Ye, Y. Nie, X. Chen, H. Yan, W. Tian, Bioengineered tumor microenvironments with naked mole rats high-molecular-weight hyaluronan induces apoptosis in breast cancer cells, *Oncogene* 38 (2019) 4297–4309. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0719-4>.
- [139] M. Cassano, G.M. Russo, C. Granieri, P. Cassano, Cytofunctional changes in nasal ciliated cells in patients treated with hyaluronate after nasal surgery, *Am J Rhinol Allergy* 30 (2016) 83–88. <https://doi.org/10.2500/AJRA.2016.30.4284>.
- [140] P. Dahiya, R. Kamal, Hyaluronic Acid: A Boon in Periodontal Therapy, *N Am J Med Sci* 5 (2013) 309. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.112473>.
- [141] J.P. Ortonne, A controlled study of the activity of hyaluronic acid in the treatment of venous leg ulcers, *Journal of Dermatological Treatment* 7 (1996) 75–81. <https://doi.org/10.3109/09546639609089533>.
- [142] J.C. Goddard, D.A.W. Janssen, Intravesical hyaluronic acid and chondroitin sulfate for recurrent urinary tract infections: systematic review and meta-analysis, *Int Urogynecol J* 29 (2018) 933–942. <https://doi.org/10.1007/S00192-017-3508-Z>.
- [143] T. Ząbkowski, B. Jurkiewicz, M. Saracyn, Treatment of Recurrent Bacterial Cystitis by Intravesical Instillations of Hyaluronic Acid., *Urol J* 12 (2015) 2192–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26135937> (accessed January 2, 2024).
- [144] A. Simon, A. Safran, A. Revel, E. Aizenman, B. Reubinoff, A. Porat-Katz, A. Lewin, N. Laufer, Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human

embryo transfer medium, *Fertil Steril* 79 (2003) 1434–1438. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00349-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00349-2).

- [145] V. Du Nguyen, S. Zheng, J. Han, V.H. Le, J.O. Park, S. Park, Nanohybrid magnetic liposome functionalized with hyaluronic acid for enhanced cellular uptake and near-infrared-triggered drug release, *Colloids Surf B Biointerfaces* 154 (2017) 104–114. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.03.008>.
- [146] H. Trommer, S. Wartewig, R. Böttcher, A. Pöpl, J. Hoentsch, J.H. Ozegowski, R.H.H. Neubert, The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation, *Int J Pharm* 254 (2003) 223–234. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00033-4).
- [147] S. Fagien, D. Cassuto, Reconstituted injectable hyaluronic acid: expanded applications in facial aesthetics and additional thoughts on the mechanism of action in cosmetic medicine, *Plast Reconstr Surg* 130 (2012) 208–217. <https://doi.org/10.1097/PRS.0B013E318254B3F6>.
- [148] V. Nobile, D. Buonocore, A. Michelotti, F. Marzatico, Anti-aging and filling efficacy of six types hyaluronic acid based dermo-cosmetic treatment: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety, *J Cosmet Dermatol* 13 (2014) 277–287. <https://doi.org/10.1111/JOCD.12120>.
- [149] R. Janiš, V. Pata, P. Egner, J. Pavlačková, A. Zapletalová, K. Kejlová, Comparison of metrological techniques for evaluation of the impact of a cosmetic product containing hyaluronic acid on the properties of skin surface, *Biointerphases* 12 (2017). <https://doi.org/10.1116/1.4985696/237569>.
- [150] M. Kimura, T. Maeshima, T. Kubota, H. Kurihara, Y. Masuda, Y. Nomura, Absorption of Orally Administered Hyaluronan, *J Med Food* 19 (2016) 1172–1179. <https://doi.org/10.1089/JMF.2016.3725>.
- [151] T. Sato, H. Iwaso, An Effectiveness Study of Hyaluronic acid 【Hyabest® (J)】 in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee on the Patients in the United States】 , (2009).
- [152] F. Bongiovì, C. Fiorica, F.S. Palumbo, G. Di Prima, G. Giammona, G. Pitarresi, Imatinib-Loaded Micelles of Hyaluronic Acid Derivatives for Potential Treatment of Neovascular Ocular Diseases, *Mol Pharm* 15 (2018) 5031–5045. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.8B00620/ASSET/IMAGES/LARGE/MP-2018-00620R_0008.JPEG.
- [153] G. Huerta-Ángeles, F. Ondreáš, M. Brandejsová, K. Kopecká, H. Vagnerová, J. Kulhánek, T. Drmota, Formulation of hyaluronan grafted with dodecanoic acid as a potential ophthalmic treatment, *Carbohydr Polym* 246 (2020) 116578. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116578>.
- [154] M.J. Zenker, R.C. Borden, M.A. Barlaz, Occurrence and Treatment of 1,4-Dioxane in Aqueous Environments, *Environ Eng Sci* 20 (2003) 423–432. <https://doi.org/10.1089/109287503768335913>.

- [155] J. Mazurkiewicz, P. Tomasik, Why 1,4-dioxane is a water-structure breaker, *J Mol Liq* 126 (2006) 111–116. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2005.11.033>.
- [156] F. Hovorka, R.A. Schaefer, D. Dreisbach, The System Dioxane and Water, *J Am Chem Soc* 58 (1936) 2264–2267. https://doi.org/10.1021/JA01302A051/ASSET/JA01302A051.FP.PNG_V03.
- [157] D. McGregor, Tertiary-Butanol: A toxicological review, *Crit Rev Toxicol* 40 (2010) 697–727. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.494249>.
- [158] tert-Butanol | (CH₃)₃COH | CID 6386 - PubChem, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6386> (accessed May 8, 2024).
- [159] B. Kežić, A. Perera, Aqueous tert-butanol mixtures: A model for molecular-emulsions, *Journal of Chemical Physics* 137 (2012). <https://doi.org/10.1063/1.4730524/191607>.
- [160] J.L. Finney, D.T. Bowron, A.K. Soper, The structure of aqueous solutions of tertiary butanol, *Journal of Physics: Condensed Matter* 12 (2000) A123. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/12/8A/313>.
- [161] B.D.T. Bowron, J.L. Finney, A.K. Soper, The structure of pure tertiary butanol, *Mol Phys* 93 (1998) 531–543. <https://doi.org/10.1080/002689798168871>.
- [162] J.M. Andanson, J.C. Soetens, T. Tassaing, M. Besnard, Hydrogen bonding in supercritical tert-butanol assessed by vibrational spectroscopies and molecular-dynamics simulations, *Journal of Chemical Physics* 122 (2005). <https://doi.org/10.1063/1.1886730/921883>.
- [163] B.J. Alder, T.E. Wainwright, Phase Transition for a Hard Sphere System, *J Chem Phys* 27 (1957) 1208–1209. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>.
- [164] J.A. McCammon, B.R. Gelin, M. Karplus, Dynamics of folded proteins, *Nature* 1977 267:5612 267 (1977) 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>.
- [165] S.A. Hollingsworth, R.O. Dror, Molecular Dynamics Simulation for All, *Neuron* 99 (2018) 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.08.011>.
- [166] J.W. Ponder, D.A. Case, Force Fields for Protein Simulations, *Adv Protein Chem* 66 (2003) 27–85. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(03\)66002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(03)66002-X).
- [167] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, A.D. Mackerell, CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields, *J Comput Chem* 31 (2010) 671–690. <https://doi.org/10.1002/JCC.21367>.
- [168] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general amber force field, *J Comput Chem* 25 (2004) 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/JCC.20035>.
- [169] N. Schmid, A.P. Eichenberger, A. Choutko, S. Riniker, M. Winger, A.E. Mark, W.F. Van Gunsteren, Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7,

European Biophysics Journal 40 (2011) 843–856. <https://doi.org/10.1007/S00249-011-0700-9/FIGURES/12>.

- [170] W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids, *J Am Chem Soc* 118 (1996) 11225–11236. https://doi.org/10.1021/JA9621760/SUPPL_FILE/JA11225.PDF.
- [171] A. Brunger, X-PLOR Version 3.1: A System for X-ray Crystallography and NMR, *Computer Science, Biology, Chemistry* (1992). <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:60424400> (accessed May 11, 2024).
- [172] H.M. Senn, W. Thiel, H.M. Senn, W. Thiel, QM/MM Methods for Biomolecular Systems, *Angewandte Chemie International Edition* 48 (2009) 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200802019>.
- [173] NAMD - Scalable Molecular Dynamics, (n.d.). <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/> (accessed May 11, 2024).
- [174] MetaCentrum (MetaVO) - virtuální organizace pro celou akademickou obec, (n.d.). <https://metavo.metacentrum.cz/> (accessed May 11, 2024).
- [175] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J Mol Graph* 14 (1996) 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [176] C. Vega, J.L.F. Abascal, M.M. Conde, J.L. Aragones, What ice can teach us about water interactions: a critical comparison of the performance of different water models, *Faraday Discuss.* 141 (2009) 251–276. <https://doi.org/10.1039/B805531A>.
- [177] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma, The missing term in effective pair potentials, *Journal of Physical Chemistry* 91 (1987) 6269–6271. https://doi.org/10.1021/J100308A038/ASSET/J100308A038.FP.PNG_V03.
- [178] S. Izadi, R. Anandkrishnan, A. V. Onufriev, Building water models: A different approach, *Journal of Physical Chemistry Letters* 5 (2014) 3863–3871. https://doi.org/10.1021/JZ501780A/SUPPL_FILE/JZ501780A_SI_001.PDF.
- [179] L. Martínez, R. Andrade, E.G. Birgin, J.M. Martínez, Software News and Update Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations, (2009). <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>.
- [180] Home — Spyder IDE, (n.d.). <https://www.spyder-ide.org/> (accessed May 11, 2024).
- [181] MDAnalysis · MDAnalysis, (n.d.). <https://www.mdanalysis.org/> (accessed May 21, 2024).
- [182] A. Kolaříková, A. Perera, Concentration Fluctuation/Microheterogeneity Duality Illustrated with Aqueous 1,4-Dioxane Mixtures, *J Chem Theory Comput* 20 (2024) 3473–3483. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.4c00151>.
- [183] E. Kutáľková, M. Ingr, A. Kolaříková, J. Hrnčířík, R. Witasek, M. Hermannová, O. Štrýmpl, G. Huerta-Ángeles, Structure and dynamics of the hyaluronan oligosaccharides and their

solvation shell in water: organic mixed solvents, *Carbohydr Polym* 304 (2023) 120506.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120506>.

- [184] A. Kolaříková, E. Kutálková, J. Hrnčířík, M. Ingr, Hyaluronan oligosaccharides form double-helical duplexes in water:1,4-dioxane mixed solvent, *Carbohydr Polym* 326 (2024) 121632.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2023.121632>.
- [185] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: Fast, flexible, and free, *J Comput Chem* 26 (2005) 1701–1718.
<https://doi.org/10.1002/JCC.20291>.

Seznam obrázků

<i>Obr. 1 – Struktura hyaluronanu: GCU (vlevo) a NAG (vpravo) [85]</i>	13
<i>Obr. 2 – Předpokládaná přirozená struktura řetězce HA s intramolekulárními vodíkovými vazbami [87]</i>	14
<i>Obr. 3 – Terciární struktura HA podle článku J. Sheehana [93] (a – jeden řetězec, b – dvoušroubovice, c – detail orientace bočních skupin)</i>	15
<i>Obr. 4 – Vizualizace vodního mostu mezi HA řetězci</i>	18
<i>Obr. 5 – HA modifikovaná (a) dodecyloaminem [1], (b) oleylaminem [44] a (c) esterifikací mastnými kyselinami [3]</i>	23
<i>Obr. 6 – Struktura 1,4-dioxanu (a) a jeho vizualizace v MD simulaci (b)</i>	24
<i>Obr. 7 – Struktura terc-butanolu (a) a jeho vyobrazení v simulaci (b)</i>	25
<i>Obr. 8 – Definice dihedrálních úhlů na glykosidických vazbách [120]</i>	32
<i>Obr. 9 – Ilustrace referenčních a skutečných řetězců, pro výpočet jejich střední vzdálenosti podle rovnice (3) a matematického postupu, popsaného v bodech 1–3. Modré body představují jednotlivé atomy, červené a fialové vzdálenosti r_{ij} představují rozdíl $r_i - r_j$ [92]</i>	33
<i>Obr. 10 – Detail fixace pozice řetězců, kdy fixované atomy jsou zvětšeny a znázorněny černou barvou (vlevo). Přehled používaného značení atomů HA (vpravo) [92]</i>	35
<i>Obr. 11 – Četnost vodíkových vazeb (červeně) a vodních (modře) a iontových (žlutě) mostů v různě koncentrovaných vodných roztocích NaCl za dvou různých teplot [92]</i>	35
<i>Obr. 12 – Vizualizace nejčastějších typů vodíkových vazeb. Atomy jsou značeny v souladu s Obr. 9. [92]</i>	36
<i>Obr. 13 – Vypočítané KBI pro směs vody a dioxanu (znázorněno body), ve srovnání s experimentálními výsledky (znázorněny plnou čarou), kde x představuje molární zlomek dioxanu. KBI pro interakci vody s vodou (G_{vv}) je znázorněno modře, interakce vody a dioxanu (G_{vd}) zeleně a interakce dioxanu s dioxanem (G_{dd}) červeně. Tyrkysová barva naznačuje výsledky G_{vv} bez korekcí. [182]</i>	38
<i>Obr. 14 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovanou čarou) a organických složek (plnou čarou) v okolí HA řetězce při 0.1M koncentraci soli. Vzájemné poměry vody a organické složky jsou zde vyjádřeny jejím objemovým zlomkem. [183]</i>	39
<i>Obr. 15 – Místa nejčastějšího navázání iontů [183]</i>	41

<i>Obr. 16 – Přehled časového vývoje D_{MD} glykosidických kyslíků (fialově) a karboxylových skupin (červeně) mezi HA řetězci ve směsných rozpouštědlech (za přítomnosti NaCl). Zelenou barvou je znázorněna oblast, ve které může docházet ke stabilní interakci.</i>	42
<i>Obr. 17 – Antiparalelní (A) a paralelní (B) dvoušroubovice HA, zformované ve směsi w:d_0.08M, se zvýrazněnými iontovými mosty mezi karboxylovými skupinami. [184]</i>	43
<i>Obr. 18 – Střední vzdálenost řetězců D_{MD} po přenesení antiparalelní šroubovice do rozpouštědel s 0M koncentrací NaCl (vlevo). Dvoušroubovice vpravo je vizualizací systému a_w:d_0M (odpovídá tedy oranžové křivce v grafu).</i>	44
<i>Obr. 19 – Graf časového vývoje D_{MD} glykosidických kyslíků (fialově) a karboxylových skupin (červeně) mezi dlouhými antiparalelními řetězci HA v w:d_0.1M prostředí. Zelenou barvou je znázorněna oblast, kde nejčastěji dochází k interakci. Pod grafem je vizualizace systému v 160. ns simulace včetně iontů v jeho nejbližším okolí. [184]</i>	45
<i>Obr. 20 – Počáteční orientace při simulaci aldehydových řetězců dle výše uvedeného rozdělení (fialovou barvou jsou znázorněny uhlíkové atomy s fixovanou polohou)</i>	46
<i>Obr. 21 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára v grafu A), organické složky (plná čára v grafu A) a sodných iontů (plná čára v grafu B) v okolí samostatného alifatického řetězce</i>	47
<i>Obr. 22 – Vzdálenost konců alifatického řetězce v různých systémech (vlevo) s vizualizací, jak byla tato vzdálenost měřena (vpravo)</i>	48
<i>Obr. 23 – Srovnání vzdálenosti konců dvojic alifatických řetězců (D_{END}), kdy pro každý systém se jedná o hodnotu vzdálenosti, zprůměrovanou z obou řetězců (vlevo). Vpravo: vizualizace stáčení dvojic řetězců v čisté vodě (w) a naopak jejich narovnání v terc-butanolové směsi (w:t)</i>	49
<i>Obr. 24 – Střední vzdálenost řetězců (D_{MD}) pro systémy a, b (vlevo) a c (vpravo)</i>	50
<i>Obr. 25 – Varianty substituovaných systémů na počátku simulace, označených podle čísla sacharidového residua, na kterém jsou substituenty navázány (A) a detail navázání substituentu (B)</i>	51
<i>Obr. 26 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára) a organické složky (plná čára) v okolí substituentů na řetězci a1a19 (A) a v okolí jeho HA páteře (B).....</i>	52
<i>Obr. 27 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára) a organické složky (plná čára) v okolí celého řetězce pro všechny systémy substituované HA</i>	54

<i>Obr. 28 – Radiální distribuční funkce sodných (tlustá čára) a chloridových (tenká čára) iontů v okolí substituentů na řetězci a1a19 (A) a v okolí jeho HA páteře (B) pro nenulové koncentrace soli. Na grafu B je dále znázorněn i celkový náboj v dané vzdálenosti od páteře (přerušovaná čára).</i>	55
<i>Obr. 29 – Radiální distribuční funkce sodných iontů v okolí celých řetězců (včetně substituentů)</i>	56
<i>Obr. 30 – Přehled počtu atomů HA v blízkosti jednotlivých substituentů (N_{HA}), označených dle monosacharidového residua, na kterém se nacházely, vč. průměru, znázorněného černě (nahore). Odchytky nejsou uvedeny, jelikož byly řádově menší než zobrazené hodnoty. Vizualizace systémů a1a9a19 v různých prostředích (dole). Substituenty jsou zde znázorněny šedou barvou a HA páteř je zbarvená podle tří použitých rozpouštědel – čisté vody (modře), směsi voda:dioxan (oranžově) a směsi voda:terc-butanol (zeleně).</i>	57
<i>Obr. 31 – A: Schematická definice dvou vybraných oblastí, ze kterých se substituenty mohou přiblížit k řetězci. B: Graf poměru přiblížení substituentů z těchto dvou směrů v různých rozpouštědlech (ve srovnání s geometrickým poměrem objemů oblastí – přerušovaná čára). C: Vizualizace paralelního přiblížení. D: Vizualizace přiblížení ze strany.</i>	58
<i>Obr. 32 – Vzdálenost konců (D_{END}) různě substituovaných řetězců HA</i>	59
<i>Obr. 33 – Řetězec HA se substituenty, orientovanými dovnitř terc-butanolových mikro-domén (vlevo) s vizualizací molekul terc-butanolu do vzdálenosti 5 Å od řetězce (vpravo).</i>	60
<i>Obr. 34 – Průměrná vzdálenost konců (D_{END}) nesubstituovaných (šedé sloupce) a substituovaných řetězců HA (barevné sloupce) při 0.1M koncentraci NaCl. Odchytky nejsou uvedeny, jelikož byly řádově menší než zobrazené hodnoty.</i>	61
<i>Obr. 35 – Časový průběh vzdálenosti konců řetězce v systému a1a19_w:d_0.1M (vlevo) a konformace řetězce v okamžiku ohnutí (vpravo)</i>	61
<i>Obr. 36 – Průměrná vzdálenost konců řetězce v různých prostředích (modře) ve srovnání s časem separace – tedy s dobou, za kterou vzdálenost konců narostla na minimálně 30 Å (oranžově).</i>	62
<i>Obr. 37 – Počáteční konformace dvojic substituovaných řetězců.</i>	64
<i>Obr. 38 – Srovnání průměrných hodnot střední vzdálenosti řetězců (D_{MD}) mezi všemi substituovanými (kulaté body) a všemi nesubstituovanými antiparalelně orientovanými HA řetězci (hrnaté body).</i>	64
<i>Obr. 39 – Přehled průměrné střední vzdálenosti mezi substituovanými HA řetězci (vlevo) a vizualizace systémů, které se k sobě nejvíce přiblížily (vpravo).</i>	65

<i>Obr. 40 – Průměrná hodnota počtu iontových (A) a vodních (B) mostů v jednom simulačním kroku.....</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 41 – Časový vývoj střední vzdálenosti řetězců D_{MD} a počtu iontových mostů (Ibr) a vodíkových vazeb (HB) mezi nimi v průběhu simulace systému $aA_w_0.2M$ (vlevo). Pravá část obrázku představuje vizualizaci řetězců tohoto systému v průběhu simulace.</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 42 – Průměrný počet vodíkových vazeb na jeden krok simulace (vlevo) a vpravo přehled označení atomů substituované HA (včetně případného alifatického substituentu).....</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 43 – Časový vývoj střední vzdálenosti řetězců (D_{MD}) a počtu iontových mostů (Ibr) a vodíkových vazeb (HB) mezi nimi v průběhu simulace systému $aA_w:t_0.2M$ (vlevo). Pravá část obrázku představuje vizualizaci řetězců tohoto systému v průběhu simulace.</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 44 – Kumulativní graf atomů, nejčastěji se podílejících se na vodíkových vazbách v roli donorů (vlevo) a akceptorů (vpravo) mezi substituovanými řetězci. Hodnoty byly průměrovány mezi všemi druhy rozpouštědel. Pro používané značení atomů viz Obr. 41.</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 45 – Vizualizace různých typů interakcí mezi substituovanými řetězci – iontové mosty (A, B), vodné mosty (C) a nejčastější typy vodíkových vazeb: (D – G).....</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 46 – Časový vývoj střední vzdálenosti (D_{MD}) substituovaných řetězců (fialově) ve směsném rozpouštědle voda:dioxan, D_{MD} mezi substituenty na r9 (modře), substituenty na r19 jednoho řetězce a r19 druhého (tyrkysově) a naopak substituenty na r19 jednoho a r1 druhého řetězce (růžově). Ve spodní části obrázku jsou zachyceny snímky vybraných systémů (časový bod jejich pořízení je v grafech označen červenou čarou).....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 47 – Ukázka nejrůznějších konformací řetězců, ovlivněných interakcí substituentů. Barevné značení odpovídá tomu na Obr. 45, tedy fialová pro HA páteř a růžová, zelená a modrá pro jednotlivé substituenty.</i>	<i>72</i>
<i>Obr. 48 – Systém $aAAA_w:t_0.1M$, 160. ns (vlevo). Distribuce molekul terc-butanolu (zeleně) ve vzdálenosti do 4 Å od řetězců tohoto systému (vpravo).</i>	<i>73</i>
<i>Obr. 49 – Vzdálenost konců (D_{END}) interagujících substituovaných HA řetězců (barevné sloupce) a samostatných substituovaných řetězců (šedé sloupce). Průměrné hodnoty pro jednotlivá rozpouštědla jsou označeny přerušovanou čarou.....</i>	<i>73</i>

Seznam tabulek

<i>Tab. 1 – V textu používané značení simulačních prostředí</i>	30
<i>Tab. 2 – Průměrný podíl atomů organické a vodné složky rozpouštědla (d/w a t/w) v bezprostřední blízkosti samostatných alifatických řetězců (sekce A), v okolí substituentů na HA řetězcích (sekce B) a podíl vodné a organické složky (w/d a w/t) poblíž HA páteře (sekce C). Hodnoty jsou průměrovány mezi všemi systémy, v pravé části každé sekce pak také mezi všemi koncentracemi soli.</i>	53

Seznam použitých zkratk

a1	řetězec, substituovaný na 1. sacharidovém cyklu
a9	řetězec, substituovaný na 9. sacharidovém cyklu
a1a19	řetězec, substituovaný na 1. a 19. sacharidovém cyklu
a1a9a19	řetězec, substituovaný na 1., 9. a 19. sacharidovém cyklu
a1a11a19	řetězec, substituovaný na 1., 11. a 19. sacharidovém cyklu
aA	dva antiparalelní řetězce A12
aAA	dva antiparalelní řetězce AA
aAAA	dva antiparalelní řetězce AA10A
AFM	mikroskopie atomárních sil
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
DX	1,4-dioxan
ECM	extracelulární matrix (neboli mezibuněčná hmota)
EHMW-HA	extra-vysoko-molekulární kyselina hyaluronová
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GCU nebo G_	kyselina β -D-glukuronová
GROMOS	GRONingen MOlecular Simulation
HA	kyselina hyaluronová resp. hyaluronan
HB	vodíkové můstky
CHARMM	Chemistry at HaRvard Macromolecular Mechanics
lbr	lontové mosty
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KBI	Kirkwood-Buffovy integrály
MD	molekulová dynamika
NAG nebo N_	β -D-N-acetylglukosamin
NAMD	nanoscale molecular dynamics

NMR	nukleová magnetická resonance
OPC	Optimal Point Charge
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations
PME	Particle Mesh Ewald
RDF	radiální distribuční funkce
SPC(E)	(Extended) Simple Point Charge
SPYDER	The scientific python development environment
TB	terc-butanol
TIP3P	Transferable Intermolecular Potential with 3 Points
VdW	Van der Waalsova
VMD	visual molecular dynamics
Wbr	vodní mosty
w:d	směsné rozpouštědlo voda:dioxan
w:t	směsné rozpouštědlo voda:terc-butanol
X-PLOR	X-ray eXPLOration

Publikační aktivity autorky

Články publikované v impaktovaných časopisech:

A. Kolaříková, E. Kutálková, V. Buš, R. Witasek, J. Hrnčířík, M. Ingr, Salt-dependent intermolecular interactions of hyaluronan molecules mediate the formation of temporary duplex structures, *Carbohydrate Polymers*. 286 (2022) 121632. DOI: [10.1016/j.carbpol.2022.119288](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119288)

E. Kutálková, M. Ingr, **A. Kolaříková**, J. Hrnčířík, R. Witasek, M. Hermannová, O. Štrympl, G. Huerta-Ángeles, Structure and dynamics of the hyaluronan oligosaccharides and their solvation shell in water: organic mixed solvents, *Carbohydrate Polymers*. 304 (2023) 120506. DOI: [10.1016/j.carbpol.2022.120506](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120506)

A. Kolaříková, E. Kutálková, J. Hrnčířík, M. Ingr, Hyaluronan oligosaccharides form double-helical duplexes in water:1,4-dioxane mixed solvent, *Carbohydrate Polymers*. 326 (2024) 121632. DOI: [10.1016/j.carbpol.2023.121632](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121632)

A. Kolaříková, A. Perera, Concentration Fluctuation/ Microheterogeneity Duality Illustrated with Aqueous 1,4-Dioxane Mixtures, *Journal of Chemical Theory and Computation*. 20 (2024) 3473–3483. DOI: [10.1021/acs.jctc.4c00151](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.4c00151)

Odborný životopis autorky

Jméno: **Ing. Alena Kolaříková**
Datum narození: 15.8.1997
Místo narození: Zlín
Adresa: Palackého nám. 373 Vizovice 763 12
Email: a3_kolarikova@utb.cz
Telefon: +420 739 741 064

Vzdělání

- 2021–dosud Doktorské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav fyziky a materiálového inženýrství; doktorský studijní program: Technologie makromolekulárních látek.
Téma disertační práce: Struktura, dynamika a interakce substituovaných molekul hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech
- 2024–dosud CŽV na Masarykově univerzitě v Brně, předměty Mechanika a molekulová fyzika, Elektřina a magnetismus, Základy programování a Úvod do fyziky mikrosvěta
- 2019–2021 Magisterské studium (titul Ing.) – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů; magisterský studijní program: Inženýrství polymerů.
Závěrečná práce: Molekulová dynamika dvou řetězců hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech (virtuální experiment)
- 2016–2019 Bakalářské studium (titul Bc.) – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů; bakalářský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Polymerní materiály a technologie
Závěrečná práce: Studium interakcí hyaluronan-hyaluronan metodou molekulové dynamiky

2012–2016

Gymnázium Zlín – Lesní čtvrť, maturitní zkouška

Zahraníční stáže a odborné akce

- 9/2023–11/2023 Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée, Sorbonne University, Francie
Téma výzkumu: Distribuce směsných rozpouštědel
Supervizor: Aurélien Perera, PhD, Hab.
16. 10. 2023 Journée Systèmes & Matière Complexes (7. ročník), Paris-Saclay, Francie – přednesena krátká prezentace „Helix formation of hyaluronan studied by molecular dynamics“

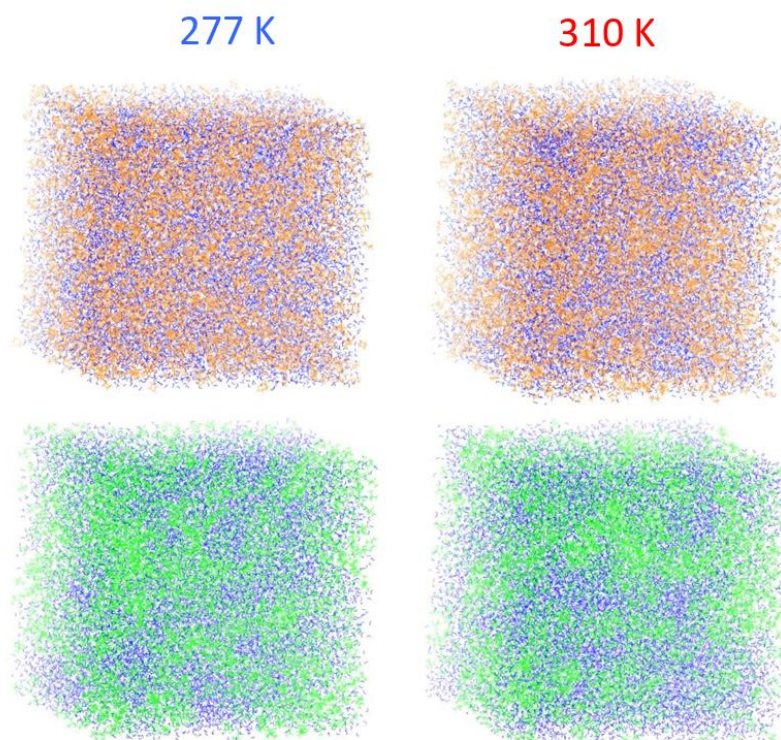
Projekty

- 2025 IGA/FT/2025/005: Teoretický a experimentální výzkum 2D a 3D strukturovaných polymerních systémů, člen řešitelského týmu
- 2024 IGA/FT/2024/007: Inovativní postupy zpracování polymerů pro pokročilé metody 3D tisku, člen řešitelského týmu
- 2023 IGA/FT/2023/006: Studium a návrh nových zpracovatelských postupů polymerních materiálů pro pokročilou aditivní výrobu, člen řešitelského týmu
- 2022 IGA/FT/2022/009: Materiály na bázi kyseliny hyaluronové a proteinů pro 3D tisk z hlediska teoretické i aplikované chemie, člen řešitelského týmu

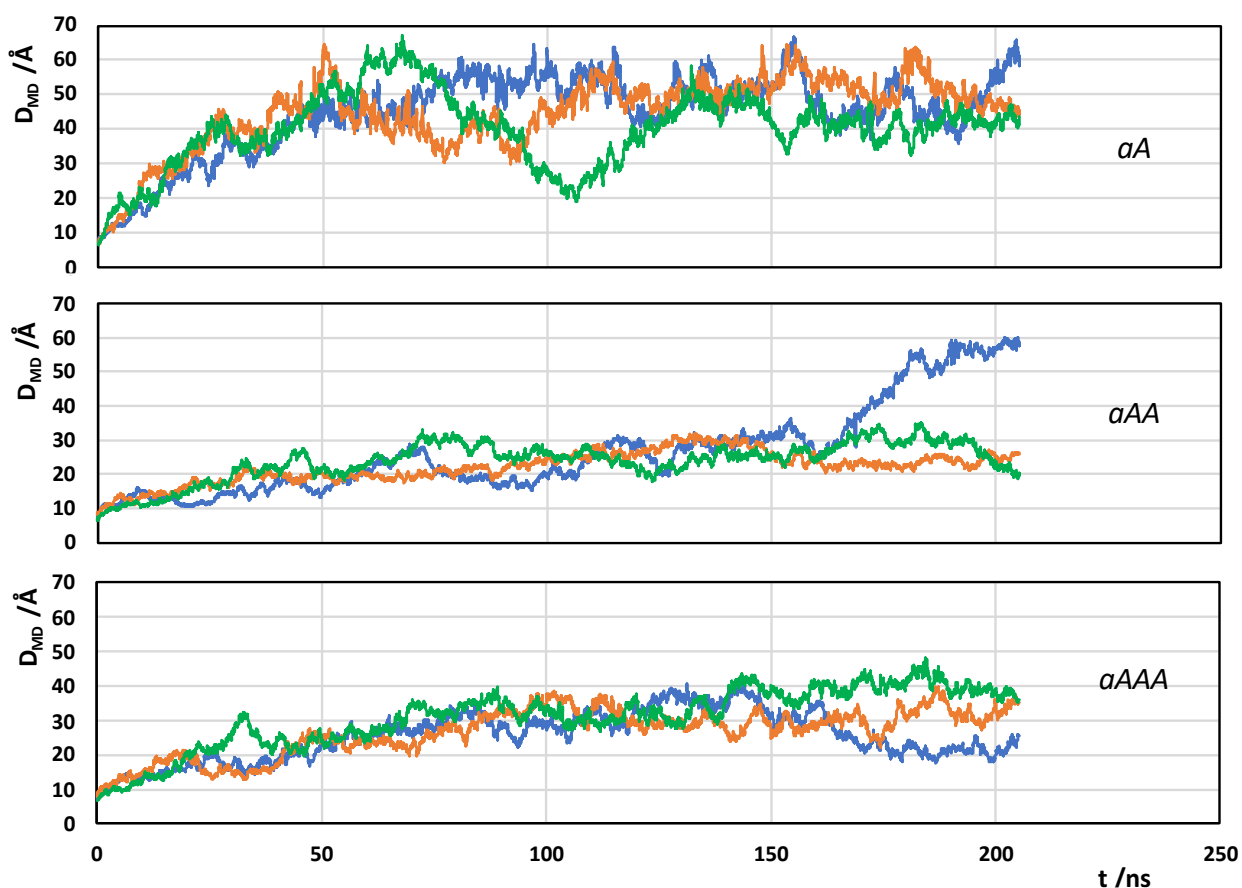
Pedagogická činnost v rámci doktorského studia

- ZS 2022, 2024 Laboratoř Molekulového modelování
- LS 2023, 2024, 2025 Seminář Fyzikální chemie a Fyzikální chemie I

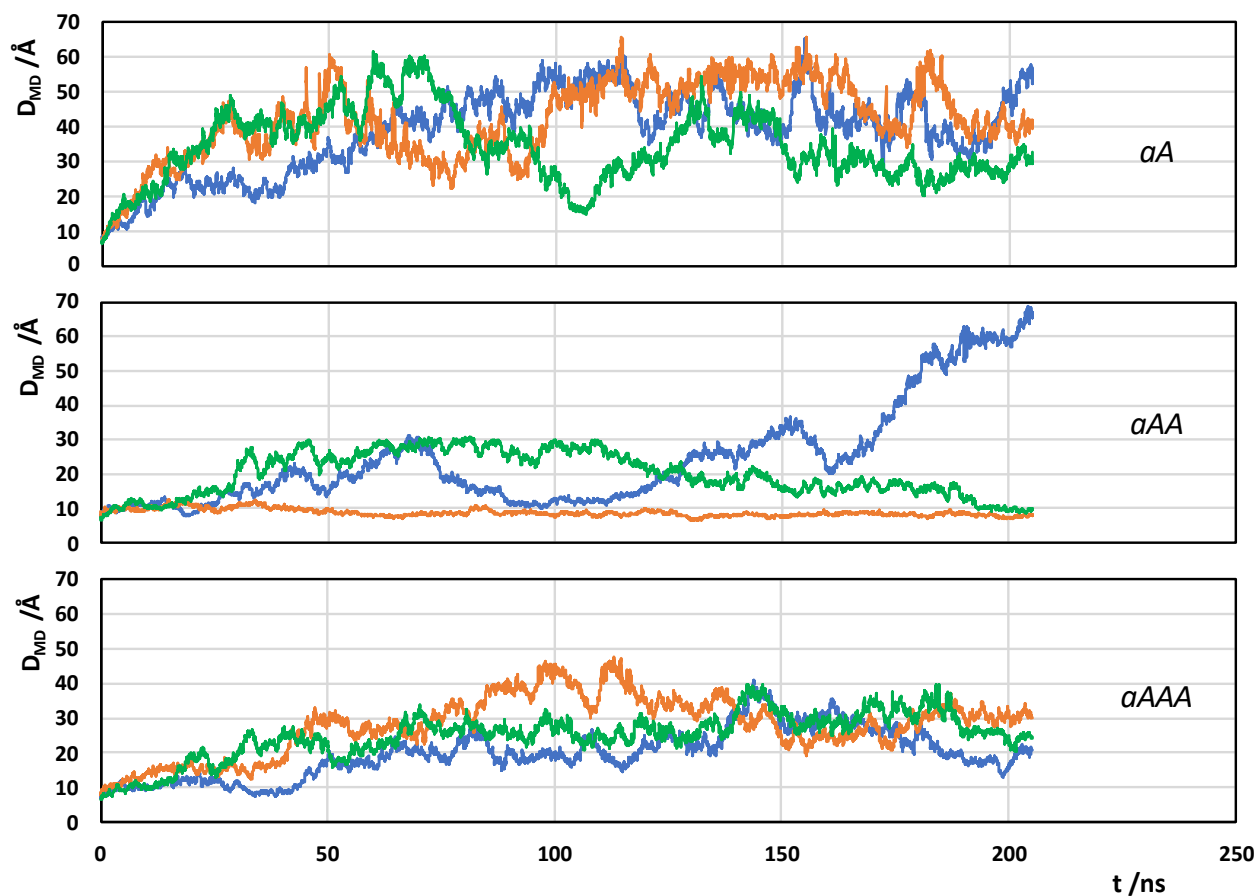
Přílohy



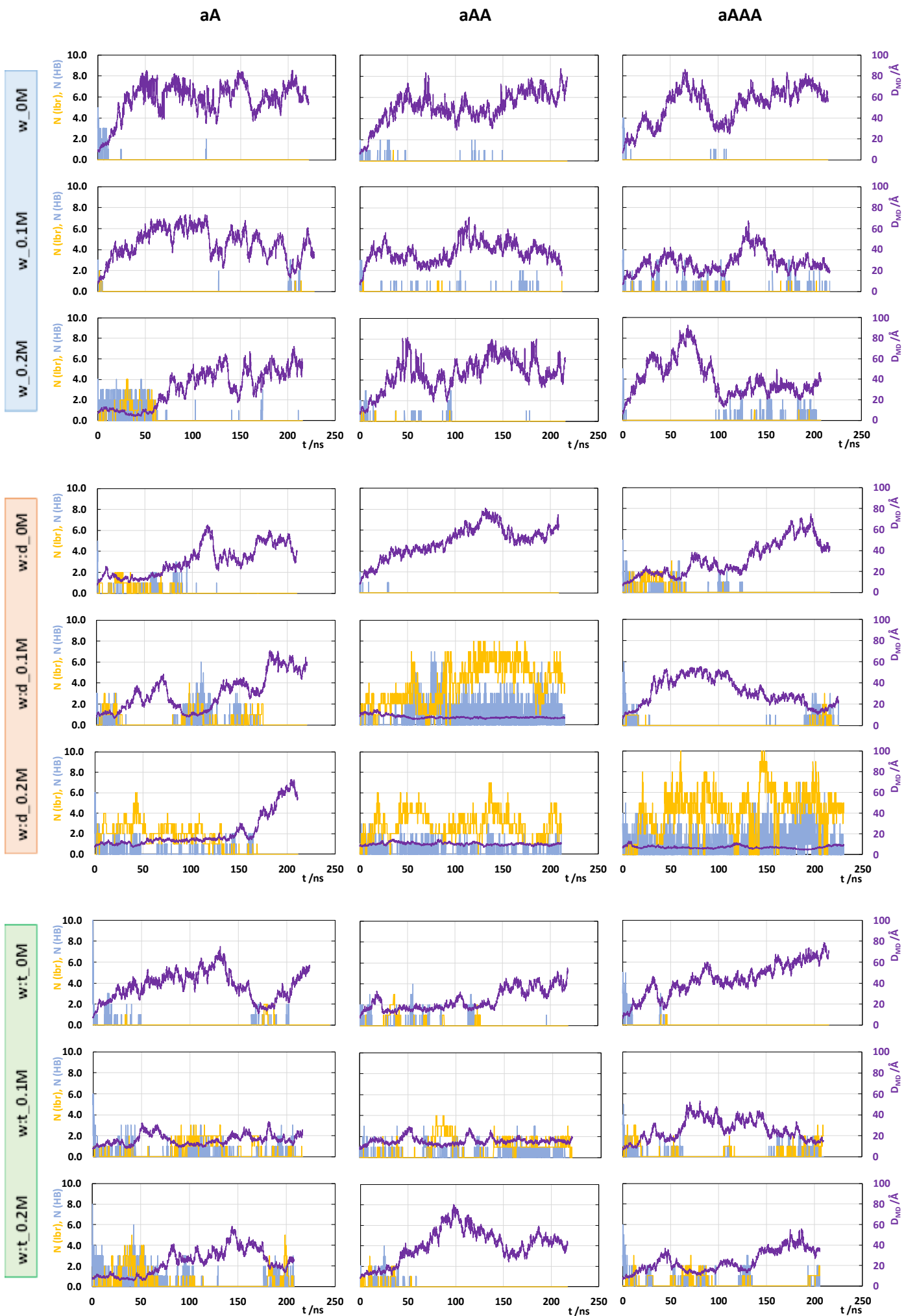
Obr. P1 – Simulační boxy se směsnými rozpouštědly voda (modrá) a 1,4-dioxan (oranžová) a voda a terc-butanol (zelená) v objemovém poměru 1:1. Velikost každého boxu je přibližně (40 Å)³.



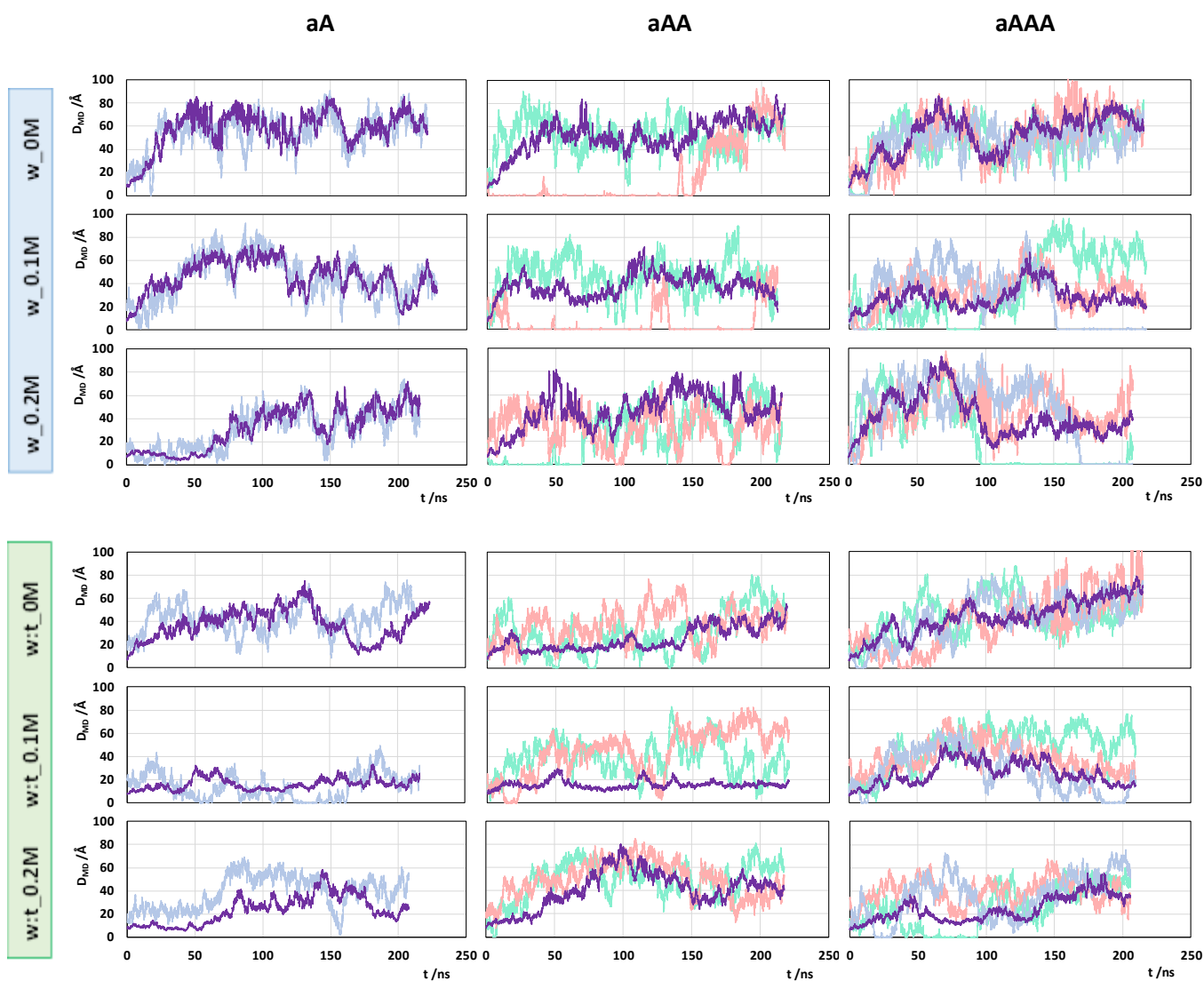
Obr. P2 – Časový vývoj průměrné střední vzdálenosti substituovaných řetězců v jednotlivých rozpouštědlech – voda (modře), voda:dioxan (oranžově) a voda:terc-butanol (zeleně). Průměr je dělán z 0M, 0.1M a 0.2M koncentrace soli.



Obr. P3 – Časový vývoj průměrné střední vzdálenosti substituovaných řetězců v nasolených rozpouštědlech – voda (modře), voda:dioxan (oranžově) a voda:terc-butanol (zeleně). Průměr je dělán z 0.1M a 0.2M koncentrace soli.



Obr. P4 (na předchozí straně) – Časový vývoj střední vzdálenosti substituovaných řetězců (D_{MD} , fialovou barvou) a počtu iontových mostů (I_{br} , žlutou barvou) a vodíkových vazeb (HB , modrou barvou) mezi nimi.



Obr. P5 – Časový vývoj střední vzdálenosti substituovaných řetězců (fialově) ve srovnání se střední vzdáleností mezi substituenty na devátém residuu (modře), mezi substituenty na prvním residuu jednoho řetězce a devatenáctým residuu druhého (tyrkysově) a mezi substituenty na devatenáctém residuu jednoho řetězce a prvním residuu druhého (růžově).