

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

Ing. Alena Kolaříková, Ph.D.

Teze disertační práce

Teze 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, Ph.D.

Studijní program: Technologie makromolekulárních látek  
(P0531D130057)

Školitel: doc. RNDr. Marek Ingr, Ph.D.  
Konzultant: RNDr. Eva Kutálková, Ph.D.

Oponenti: prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
prof. RNDr. Ing. Jaroslav Burda, DrSc.

Zlín, srpen 2025

© Alena Kolaříková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.  
Publikace byla vydána v roce 2025

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

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

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7678-349-2

*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.

## **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.

# 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.....	10
4.1.3	Syntéza hyaluronanu v živých organismech.....	11
4.1.4	Průmyslová syntéza hyaluronanu.....	11
4.1.5	Chemická struktura kyseliny hyaluronové.....	11
4.1.6	Vlastnosti.....	13
4.1.7	Aplikace kyseliny hyaluronové v praxi .....	14
4.2	Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci.....	15
4.3	Směsná rozpouštědla.....	15
4.3.1	Směs vody a 1,4-dioxanu .....	15
4.3.2	Směs vody a terc-butanolu.....	16
4.4	Molekulová dynamika .....	17
4.4.1	Princip MD simulací .....	17
4.4.2	Software NAMD 2.0 a VMD.....	17
4.4.3	Model vody TIP3P.....	18
5.	METODY .....	18
5.1	Parametry simulací .....	18
5.2	Charakterizace výsledků.....	19
6.	VÝSLEDKY.....	21
6.1	Systémy s nesubstituovanými řetězci .....	21
6.1.1	Dynamika a interakce hyaluronanu ve vodném prostředí.....	21
6.1.2	Prostředí směsných rozpouštědel .....	23
6.1.3	Dynamika hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech .....	24
6.1.4	Interakce hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech.....	25
6.2	Simulace samostatných alifatických řetězců.....	27

6.2.1	<i>Složení směsi v blízkosti alifatických řetězců</i> .....	28
6.2.2	<i>Ohebnost alifatických řetězců a jejich vzájemná interakce</i> .....	28
6.3	Hyaluronan substituovaný alifatickými řetězci.....	30
6.3.1	<i>Distribuce rozpouštědla v okolí substituovaných řetězců</i> .....	30
6.3.2	<i>Distribuce iontů v okolí substituovaných řetězců</i> .....	32
6.3.3	<i>Orientace substituentů v prostoru</i> .....	32
6.3.4	<i>Vliv substituentů na ohebnost řetězců</i> .....	33
6.4	Simulace dvou substituovaných řetězců HA.....	34
6.4.1	<i>Afinita substituovaných hyaluronanových řetězců</i> .....	35
6.4.2	<i>Typy interakcí mezi substituovanými řetězci</i> .....	35
6.4.3	<i>Interakce alifatických substituentů</i> .....	36
7.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI .....	37
8.	ZÁVĚR.....	38
	REFERENCE.....	40
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	51
	SEZNAM TABULEK .....	52
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	53
	PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORKY.....	55
	ODBOBNÝ ŽIVOTOPIS AUTORKY .....	56

# 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  $([4)\text{-}\beta\text{-d-GlcpA-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-d-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{)]}_n$  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 nejdelší (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)<sup>1</sup>.
- 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.

---

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

## **4. Teoretický rámec**

### **4.1 Kyselina hyaluronová**

Kyselina hyaluronová (nazývaná také hyaluronan, přestože hyaluronan je, technicky vzato, její polyionickou formou) je biomolekula, přirozeně se vyskytující v lidském těle. Zde hraje klíčovou roli ve fyziologické funkci kůže, kloubů a očí. Je také hlavní složkou extracelulární matrix (ECM) – tj. sítě proteinů a dalších molekul, které poskytují strukturální podporu buňkám a tkáním po celém těle.

#### **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) [49]. V hojném množství se vyskytuje také ve zrakovém systému (zejména v rohovkovém epitelu, v trabekulární síti, v zorničkách, v ECM čoček, ale také ve sklivci, v sítnici, optických nervech a dalších částech oka [50]), v dýchací soustavě (převážně v surfaktantu plicních sklípků [51], ale také v alveolách, průduškách, pohrudnici, nebo také v cévách [52]) a na mnoha dalších místech těla, (ať už se jedná o synoviální tekutinu kloubů, pupeční šňůru, orgány reprodukčního systému, nervovou tkáň nebo samotný mozek). [53,54]

#### **4.1.2 Role kyseliny hyaluronové v tělech savců**

V kloubech HA významně přispívá k viskoelastickým vlastnostem synoviální tekutiny. Působí jako přirozený lubrikant (tvoří výplň mezi pohyblivými částmi tkání), který snižuje tření mezi namáhanými kostmi a chrupavkami a zmírňuje tak jejich opotřebení, absorbuje také nárazy a během pohybu působí jako tlumič. Funguje i jako protizánětlivá látka a zprostředkovává transport živin. [15,55,56]

V očích přispívá HA ke strukturní integritě tkání, podporuje migraci buněk a buněčnou signalizaci, přidává se i při oftalmologických operacích, přestože poraněné oko je schopné si HA syntetizovat [57]. V plicních sklípcích je primární rolí HA tvorba hydrofilního gelu, který pak tvoří strukturu vodné subfáze a zahlazuje nerovnosti vrstvy buněk. Interaguje také s povrchovými fosfolipidy, čímž zvyšuje stabilitu povrchové vrstvy a aktivně brání zhroucení stěny sklípku, a navíc plní roli imunomodulátoru. [51]

Hladina HA v těle narůstá v období těhotenství [16], při boji s určitými typy onemocnění jako jsou některé záněty nebo rakovina (během níž se HA nachází přímo v nádorech či jejich okolí), nebo také při hojení ran [58]. S věkem množství HA ve

tkáních klesá a klesá také jeho kvalita (řetězce degradují na menší fragmenty, čímž se mění i jejich vlastnosti). Proto se při stárnutí v důsledku nedostatečné vlhkosti a pružnosti kůže tvoří vrásky [49].

### 4.1.3 Syntéza hyaluronanu v živých organismech

Syntéza HA probíhá prostřednictvím glykosylace – postupného navazování glukoronové kyseliny a N-acetylglukosaminu. Celá reakce je katalyzována hyaluronan syntázami a probíhá po celém těle těla – téměř ve všech místech, kde se později HA vyskytuje, může probíhat i její syntéza [57]. Kromě eukaryotických organismů dokážou HA syntetizovat také některé druhy škodlivých bakterií (převážně z rodu *Streptococcus*, ale i *Staphylococcus*, *Pasteurella* a dalších) [18,59–61].

### 4.1.4 Průmyslová syntéza hyaluronanu

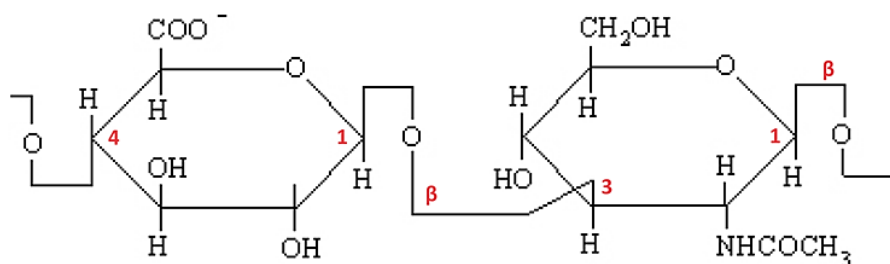
Historicky se HA extrahovala z kohoutích hřebínků. Z důvodů snížení ceny a environmentálního dopadu se většinová produkce HA zaměřila na mikrobiální fermentaci s použitím bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus* [62–64], konkrétně jeho kmenů A a C. Kvůli obavám z patogenní povahy streptokoků se dnes zkoumají alternativní metody, jako je rekombinantní produkce pomocí jiných bakterií, mezi nimi i *Escherichia coli* [65]. Problémem těchto metod je zatím cena potřebných materiálů a nedostatečná čistota produktu. [66–68]

### 4.1.5 Chemická struktura kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je lineární polymer, který patří do skupiny heteropolysacharidů zvaných glykosaminoglykany (patří sem např. heparin/heparan sulfát, chondroitin sulfát/dermatan sulfát, keratan sulfát, a právě kyselina hyaluronová). 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).

HA se skládá z alternujících monosacharidových jednotek kyseliny  $\beta$ -D-glukuronové (GCU, resp. G) a  $\beta$ -D-N-acetylglukosaminu (NAG, resp. N), spojených glykosidickými vazbami  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 (viz Obr. 1). Její struktura je velmi energeticky stabilní, jelikož všechny velké funkční skupiny jsou ve stericky preferované ekvatoriální pozici [21] a řetězce jsou navíc zpevněny intramolekulárními vodíkovými vazbami. Rotace sacharidových cyklů podél glykosidických vazeb je

proto minimální a dochází k ní převážně jen v přítomnosti iontů, které tyto vodíkové vazby rozruší (více v podkapitole 4.1.6). [17]



Obr. 1 – Struktura hyaluronanu: GCU (vlevo) a NAG (vpravo). [69]

Za fyziologických podmínek je HA disociovaná – každá karboxylová skupina má proto záporný náboj a celá HA je tak polyaniontem (proto „hyaluronan“). V roztocích obsahujících kationty (nejčastěji Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> nebo Mg<sup>2+</sup>) tvoří vysoce hydrofilní soli. Kromě viskoelastického roztoku se HA může vyskytovat také jako součást buněčných struktur, ale i ve formě nanočástic [70]. Může být lineární, nebo síťovaná (tedy ve formě hydrogelu). [71]

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, přestože ani tak není jejich vliv příliš velký (více ve výsledkové sekci) [72].

Terciární struktura HA výrazně ovlivňuje její biologické vlastnosti a sama je ovlivňována mnoha faktory (teplotou, pH, přítomností enzymů...). Za fyziologických podmínek má HA tvar velmi nabobtnalého náhodného klubka, v některých roztocích a za přítomnosti konkrétních kationtů však 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. Pozdější výzkum stejné skupiny tuto konformaci potvrdil a také byly popsány změny, způsobené úpravou pH a přítomností jiných – sodných a vápenatých – iontů. [23,73,74] Experiment J. Sheehana pak úspěšně zopakoval také S. Arnott se svou výzkumnou skupinou [75].

Ve článku J. Scotta a spol. [76] byly pozorovány rozvětvené sítě dlouhých HA řetězců a 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. V pozdějším článku téže skupiny [25] byl 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  $\beta$  skládaný list než klasickou šroubovici. Stejně páskám podobné helixy uspořádané do jakéhosi beta listu byly zkoumány výzkumnou skupinou E. Fishera (ve spolupráci se Scottovou skupinou) [26].

Podle článku P. Gribbona a spol. [77] zaujímá HA tvar šroubovice pouze v přítomnosti  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Zajímavé je, že podle jejich zjištění 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 řetězcí HA docházelo k jakékoli intermolekulární interakci.

Výzkumy skupin Ch. Blundella i N. Yaffleye přítomnost terciární struktury vyvrací. V obou případech se však jednalo pouze o HA ve vodném roztoku bez jakékoli soli a proto je možné, že pokud tam k interakcím mezi řetězcí docházelo, byly velmi slabé. [33,78] Naproti tomu skupina G. Giubertonové ve svém článku popisuje velký vliv terciární struktury HA na biologické vlastnosti [79]. Přestože nspecifikuje, o jakou terciární strukturu se zde jedná, je zde dokázána přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb.

Tím, že je případná terciární struktura HA podle většiny zdrojů udržována nekovalentními interakcemi, je závislá na mnoha faktorech. 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. [77]

#### **4.1.6 Vlastnosti**

Kyselina hyaluronová dosahuje vysokých stupňů polymerizace, čímž se liší od ostatních glykosaminoglykanů. Zatímco nízkomolekulární HA má to pouze několik kDa, vysokomolekulární HA může mít molekulovou hmotnost až 10 MDa (v lidském těle má HA hmotnost mezi 3 a 4 MDa, v závislosti na konkrétním místě výskytu či zdraví tkáni). [80,81]

Vysokomolekulární HA je viskoelastická, mukoadhezní a dobře zadržuje vlhkost. Naopak HA s nižší molekulovou hmotností podporuje angiogenezi, ale také expresi zánětlivých mediátorů. Přítomnost krátkých řetězců hyaluronanu pak může signalizovat zranění. [67]

Mezi nejdůležitější vlastnosti HA v lidském těle patří schopnost zadržovat vodu, díky čemuž hraje významnou roli nejen v procesu hydratace tkání, ale také při udržování jejich pružnosti a pevnosti a v řadě dalších buněčných procesů. HA při kontaktu s vodou mění svou sekundární strukturu a vytváří se vodní mosty, propojující různé části molekuly nebo i různé řetězce HA. [82]

U obou forem HA – s navázanou vodou i bez ní – se vyskytují hydrofilní a hydrofobní oblasti, důležité zejména pro případnou interakci s membránami nebo proteiny. Přesto u HA za běžných (fyziologických) podmínek nedochází k žádné formě samoorganizace (a pokud ano, tak jen ve velmi malé míře) [83].

HA je citlivá na degradaci volnými radikály. Ta nejčastěji probíhá na vazbách v N-acetylglukosaminu anebo C-H vazbách u kyseliny glukuronové. Proces může být inhibován určitými polysacharidy a má vliv na stabilitu a funkci HA v tkáních, protože štěpením na menší řetězce se mění její vlastnosti. [49,84,85]

### **Vlastnosti HA v roztoku**

HA řetězce v roztoku jsou zpevnovány intramolekulárními vodíkovými vazbami, vodíkovými vazbami na vodu v okolí a solvatačním obalem. [30]

Roztoky HA vykazují významné viskoelastické chování. Mimo slabých ne vazebných intramolekulárních vazeb se ve vysoce koncentrovaném roztoku HA řetězce zamotávají i fyzikálně a dochází k hydrofobní interakci mezi nepolárními postranními skupinami. Krátkodobá síť dodá roztoku gelovitou strukturu, ale je poměrně snadno rozrušitelná změnou teploty. [86] [87]

Protože HA je snadno disociovatelná, má na její konformaci v roztoku významný vliv nejen pH, ale obecně také přítomnost iontů [22,77], kdy navýšení koncentrace soli vede ke snížení gyračního poměru klubka [88,89]. Přítomností kationtů v okolí HA je také odstíněn celkový náboj a klesá elektrostatická odpudivost jednotlivých částí řetězce. Navíc dochází k rozrušení intramolekulárních vodíkových vazeb, čímž je ovlivněna i ohebnost. Přítomnost iontů tak ovlivňuje nejen permeabilitu, ale i mechanické vlastnosti. [22,89]

### **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 [90], velký potenciál má také v systémech pro dodávání léčiv. Předmětem mnoha současných výzkumů je i aplikace HA v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně, zejména v systémech nosičů léčiv s postupným uvolňováním. [91,92] Zkoumá se také potenciální využití

HA při léčbě rakoviny [93], pro léčbu onemocnění dásní a paradentózy [94], v urologii [95], nebo při IVF (*in vitro fertilisation*) jako médium [96].

Velký potenciál mají také hydrogely a to jak v podobě čisté HA, ale také různé její modifikované varianty. Využívají se pak v oftalmologii [34,97,98], pro léčbu různých poruch sluchu [36], pro léčbu kloubů [99] nebo na dermální výplně při nechirurgických operacích měkkých tkání (rty, prsa) [100]. Další možná využití jsou pak pro léčbu astmatu, retinální neovaskularizace, diabetické retinopatie nebo jako nosiče hydrofobních léčiv [3,39].

Kromě medicíny a farmacie má HA (a to nejen ve formě hydrogelu) velké využití také v kosmetice, nebo nově i jako doplněk stravy [101].

## 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.

Modifikace se obvykle provádí v organických rozpouštědlech (formamid [44], dimethylformamid [1], ale také tetrahydrofuran, 1,4-dioxan nebo terc-butanol [102]) za přítomnosti katalyzátorů a dalších látek ovlivňujících reakci. Nejčastějším místem, kam se alifatický řetězec váže, je karboxylová skupina GCU. Karboxylová skupina kyseliny glukuronové je cílem modifikací také při thiolaci i jiných chemických reakcích [35].

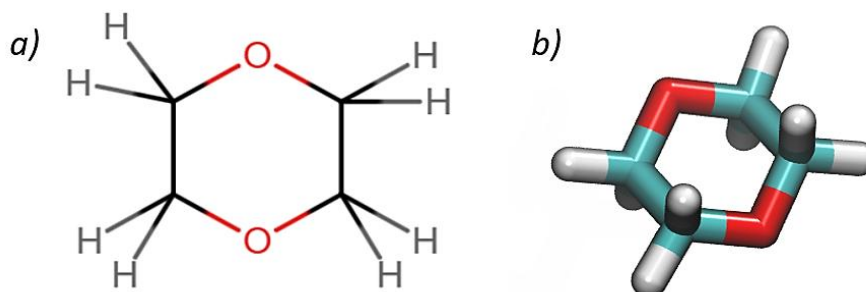
Hydrofobní HA lze získat také její esterifikací s alkylátovými mastnými kyselinami, konkrétně např. s kyselinou dodekanovou nebo stearovou. V takovém případě reakce nejčastěji probíhá na šesté alkoholové skupině N-acetyl-glukosaminu. Stejně jako u výše uváděných modifikací, i zde se mění jak chemická 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 [103]. Má tři izomery: 1,2-dioxan, 1,3-dioxan a 1,4-dioxan, který se díky své energetické stabilitě vyskytuje a využívá nejčastěji.

Molekula 1,4-dioxanu (viz Obr. 2) je symetrická a její energeticky nejvýhodnější konformace židličková. Její vlastnosti (např. dipólový moment) jsou konzistentní bez ohledu na okolní prostředí. Ve směsích s vodou dioxan narušuje vodíkové můstky mezi molekulami vody, čímž mění vlastnosti i chování těchto roztoků. [104]

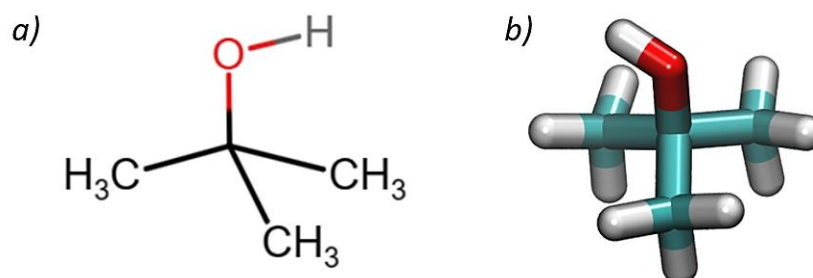


Obr. 2 – Struktura 1,4-dioxanu (a) a jeho vizualizace v MD simulaci (b).

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. [105]

#### 4.3.2 Směs vody a terc-butanolu

Terc-butanol (systematicky 2-methylpropan-2-ol) je bezbarvá olejovitá látka se silným pachem. Protože se jedná o terciární alkohol (viz Obr. 3), 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. [106,107]



Obr. 3 – Struktura terc-butanolu (a) a jeho vyobrazení v simulaci (b).

Ve směsi s vodou tvoří terc-butanol mikrodomény bohaté na terc-butanol a mikrodomény bohatší na vodu. Přestože bylo provedeno mnoho výzkumů, žádná

simulace zatím uspokojivě nevysvětlila, proč se v terc-butanolu mikrodomény tvoří. [108–111]

## 4.4 Molekulová dynamika

### 4.4.1 Princip MD simulací

Molekulová dynamika (MD) je simulační metoda pro predikci chování molekul v čase. Metoda pracuje na principu Newtonových pohybových rovnic pro jednotlivé atomy. Ty jsou reprezentované sférickými částicemi se specifickými van der Waalsovými (VdW) poloměry a náboji. Pomocí Maxwellova-Boltzmannova rozdělení jsou jednotlivým atomům náhodně přiřazeny vektory rychlostí, což umožňuje predikci jejich pohybu v čase.

Silová, resp. potenciálová pole jsou nejčastěji reprezentována párovými potenciály dvou typů: vazebné (pnutí vazeb, kmitání vazebných úhlů a rotace dihedrálních úhlů) a nevazebné (elektrostatické a VdW interakce). Silová pole popisují všechny výše uvedené interakce, dále tuhost a délku jednotlivých pružinami reprezentovaných vazeb a další parametry. Pro účely MD existuje několik různých druhů silových polí: CHARMM [112], AMBER [113], GROMOS [114], OPLS [115] nebo třeba X-PLOR [116]. Každé z nich má své specifické výhody, jako jsou rychlost výpočtu nebo naopak jeho přesnost, s čímž pak souvisí konkrétní aplikace.

Nevýhodou klasické MD je, že za obvyklých podmínek není schopná simulovat výměnu nebo redistribuci náboje mezi molekulami. Kvůli harmonické aproximaci pnutí vazeb navíc nelze simulovat jejich rozpad<sup>2</sup>. Pro simulace chemických reakcí je proto potřeba využít komplikovanější kvantově chemické výpočty [117].

### 4.4.2 Software NAMD 2.0 a VMD

Software NAMD je paralelní kód pro MD simulace biochemických systémů. K výpočtům využívá stovky procesorových jader pro obvyklé simulace a více než 500 000 jader pro ty největší systémy. Program je volně dostupný (včetně zdrojového kódu) a je kompatibilní se silovými poli CHARMM, AMBER a X-PLOR. [118]

Program VMD (Visual Molecular Dynamics) poskytuje velké 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.

---

<sup>2</sup> 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.

Díky příkazovému rozhraní TK console je pak možné vytvářet další funkce formou skriptů. [119]

### 4.4.3 Model vody TIP3P

Model TIP3P je sestaven tak, aby reprodukoval 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. Model má svá omezení zejména v oblasti nízkých teplot při simulacích pevných fází vody, ale při simulacích roztoků má ve srovnání s experimentem velmi dobré výsledky. [120]

Mezi další používané modely patří SPC/SPCE s mírně upravenými parametry a náboji na vodíkových atomech [121], TIP4P a TIP5P s parciálním nábojem volných elektronových párů na kyslíku [120] nebo OPC, čtyřbodový model, jehož geometrie je omezena pouze symetrií [122].

## 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 s naroubovanými alifatickými zbytky kyseliny stearové.

### 5.1 Parametry simulací

Protože v praxi substituční reakce probíhá v prostředí směsných rozpouštědel (voda:dioxan a voda terc-butanol), 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, vytvořených s využitím softwaru PACKMOL [123]. Ty pak byly při solvataci naskládány okolo molekul tak, aby bylo ve vzniklém (přibližně krychlovém) simulačním boxu dost prostoru pro jejich pohyb. Boxy pro menší systémy (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 byla po dobu 5–10 ps minimalizována energie. Při každé simulaci bylo také nutné aplikovat periodické okrajové podmínky 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 těch jsou dle konvence atomy kyslíku zbarveny červeně, vodík je bíle, dusík modře, sodík žlutě, chlor zeleně a uhlík tyrkysově. Organické molekuly jsou 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 vyhodnoceny i radiální distribuční funkce nebo počty vodíkových vazeb (HB). Ty zde byly 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 počet atomů v blízkosti HA molekul) byly získávány s pomocí tcl skriptů. Tak byla určována i vzdálenost konců řetězců, definovaná jako vzdálenost konkrétních atomů na opačných stranách řetězce. 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 [124] s využitím knihovny MDAnalysis [125]). Programy vyšetřovaly pozice sledovaných řetězců vůči sobě a v případě, že řetězce vlivem periodických okrajových podmínek začaly interagovat přes hranu boxu, byl jeden z nich přesunut tak, aby jeho poloha odpovídala tomuto přiblížení. Takto byly vyhodnocovány zejména: střední vzdálenost řetězců  $D_{MD}$  nebo počet iontových a vodních mostů ( $I_{br}$ ,  $W_{br}$ ) mezi HA řetězci<sup>3</sup>. Python byl použit také pro vyšetření způsobu přiblížení řetězců (viz kapitola 6.3.3).

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:

1. Byly definovány rovné, rovnoběžné a nikde se nepřekrývající referenční řetězce (viz. Obr. 4). Jednotlivé atomy v nich byly umístěny v pravidelných intervalech.
  - a. V případě vzdálenosti mezi HA řetězci šlo o interval 5 Å (po vzoru glykosidických kyslíků).
  - b. U alifatických řetězců byl interval 1.285 Å (dle vzdáleností uhlíků na řetězci).
2. Pro vzdálenosti referenčních řetězců v intervalu od 1 do 100 Å (s přírůstkem 1 Å) byla vypočítána série hodnot  $D_{ref}$  podle následujícího vzorce:

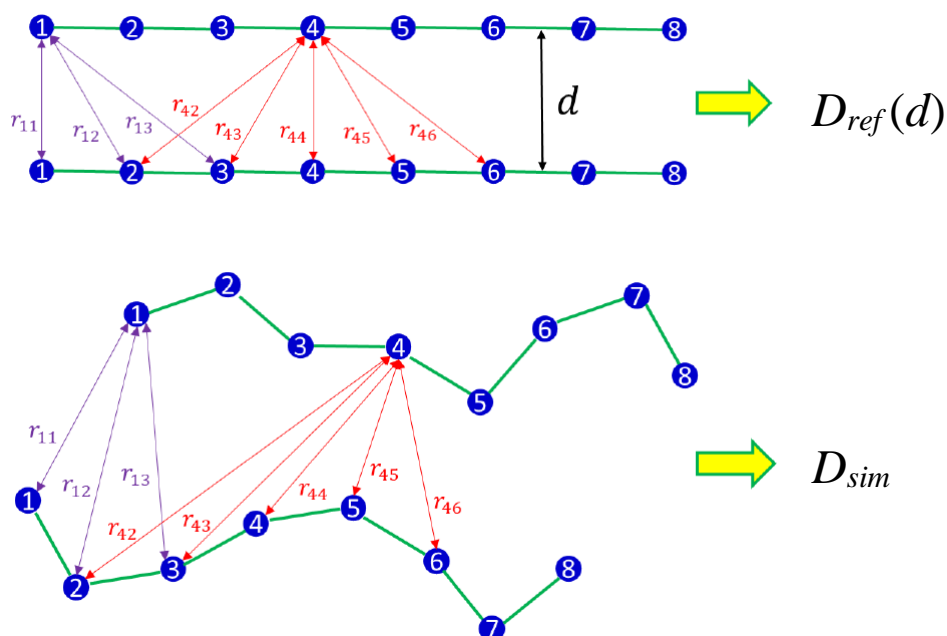
$$D_{ref}(d) = \sum_{i=1}^{N_1} \sum_{j=1}^{N_2} \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} \quad (3)$$

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).

---

<sup>3</sup> Jak  $W_{br}$  tak  $I_{br}$  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.



Obr. 4 – 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  $r_i - r_j$ . [72]

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  $D_{ref}(d)$  byla interpolována odpovídající vzdálenost  $d$ .

## 6. Výsledky

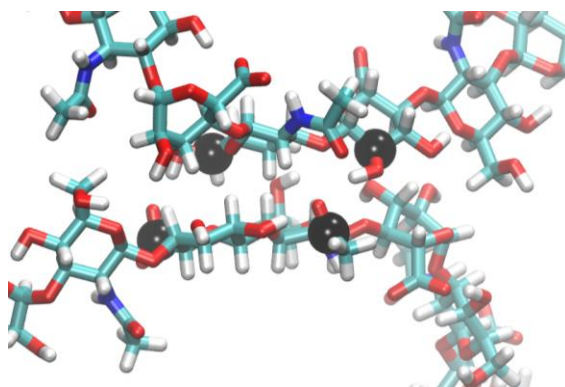
### 6.1 Systémy s nesubstituovanými řetězci

Pro tuto část výzkumu 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 ve směsných rozpouštědlech 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.

#### 6.1.1 Dynamika a interakce hyaluronanu ve vodném prostředí

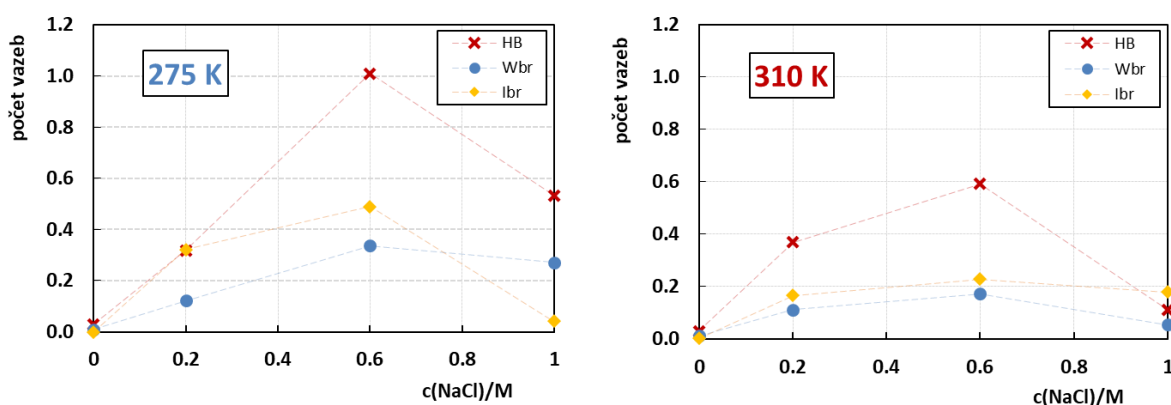
Dlouhé řetězce byly simulovány ve vodném prostředí o čtyřech různých koncentracích NaCl (0M, 0.2M, 0.6M a 1M) a to za dvou různých teplot (275 K a 310 K). Byly vůči sobě orientovány antiparalelně. Protože u téměř všech systémů

došlo poměrně rychle k jejich vzdálení, byla provedena další série výpočtů, kde byly řetězce udržovány ve vzájemné blízkosti fixací souřadnic čtyř atomů uhlíku (Obr. 5). 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.



Obr. 5 – Detail fixace pozice řetězců, kdy fixované atomy jsou zvětšeny a znázorněny černou barvou. [72]

Interakcí mezi dvojicemi HA řetězců bylo ve vodném prostředí jen velmi málo, a i to až po přidání sodné soli (která částečně kompenzovala záporný náboj řetězců a jejich elektrostatické odpuzování). Jejich míra byla posuzována zejména podle počtu iontových a vodních mostů a také intermolekulárních vodíkových vazeb (Obr. 6). Místy sice mezi řetězci docházelo i k hydrofobní interakci, ale pokud v této pozici sacharidy nebyly zafixovány pomocí vodíkových můstků, interakce trvala jen velmi krátkou dobu.



Obr. 6 – Četnost vodíkových vazeb (červeně) a vodních (modře) a iontových (žlutě) mostů v různě koncentrovaných vodných roztocích NaCl za dvou různých teplot. [72]

Závislost míry interakce na množství sodné soli nebyla lineární – v okamžiku, kdy koncentrace  $\text{Na}^+$  překročila optimální mez, se řetězce ionty zcela obklopily a jejich

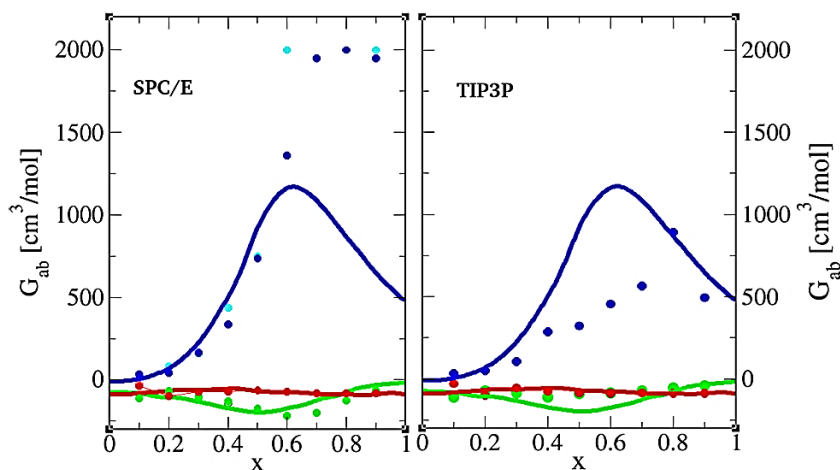
vzájemná afinita poklesla. Vlivem přítomnosti sodných iontů se navíc řetězce s rostoucí koncentrací soli stávaly HA řetězce více ohebnými, kdy maximální flexibilita byla pozorována v systému w\_0.6M.

Přestože ve vodném prostředí docházelo mezi HA řetězci za přítomnosti soli ke krátkodobým interakcím, jejich vliv byl poměrně slabý – nevznikla žádná stabilnější duplexní struktura, která by vydržela déle než několik desítek nanosekund. Podrobnější 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“ [72].

### 6.1.2 Prostředí směsných rozpouštědel

Pro ověření, zda je TIP3P dobrý model vody pro simulaci směsných rozpouštědel, byla provedena analýza<sup>4</sup> distribuce vody a 1,4-dioxanu při nejrůznějších látkových poměrech těchto dvou složek. Míra heterogenity směsí byla popsána pomocí Kirkwood-Buffových integrálů (KBI), matematického nástroje, využívaného k popisu homogenity směsi či případně míry její fázové separace.

Z přehledu KBI ( $G_{ij}$ ) pro směsi vody a dioxanu (Obr. 7) je vidět, že zatímco míra přitahování mezi molekulami vody a dioxanu nebo mezi dvojicemi molekul dioxanu (resp. mezi jejich kyslíky) byla poměrně malá, afinita molekul vody (znázorněná modrou barvou) byla v experimentálních i vypočítaných výsledcích značná.



Obr. 7 – Vypočítané KBI pro směs vody a dioxanu (znázorněno body), ve srovnání s experimentálními výsledky (znázorněny plnou čarou), kde  $x$  představuje molární zlomek

<sup>4</sup> 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 [129], který je hojně využívaný pro svou rychlost (i na méně výkonných počítačích) a podporu mnoha různých silových polí.

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 dodatečných korekcí. [126]

Z grafu také plyne, že zatímco SPC/E model lépe popisuje vodíkové vazby a vodní agregáty, při nízkém obsahu vody 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 směsného rozpouštědla je navíc slabší interakce mezi molekulami TIP3P spíše výhodou.

Všechny 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“ [126].

### 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 teplot<sup>5</sup> – 277 K a 310 K po dobu nejméně 200 ns. V každém simulačním boxu o velikosti  $(100 \text{ \AA})^3$  se kromě HA řetězce a iontů nacházelo řádově 10 000–20 000 molekul vody a 2 000– 4 000 molekul organického rozpouštědla.

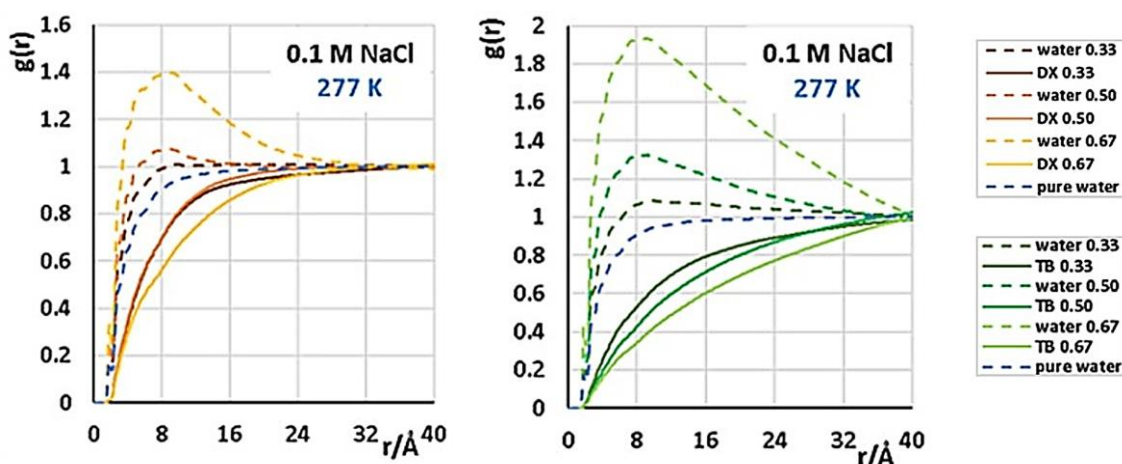
Hlavním poznatkem této části výzkumu bylo, že chování HA řetězce je výrazně ovlivněno volbou rozpouštědla a mírou separace jeho složek. Z porovnání radiálních distribučních funkcí (RDF, v grafech standardně značená  $g(r)$ ) molekul vody a organické složky v blízkosti řetězců (Obr. 8) je vidět, že v okolí záporně nabitého řetězce převažovaly molekuly vody. Ty zde díky své vysoké polaritě stabilizovaly nabitě boční skupiny a tvořily hlavní část solvátového obalu řetězců.

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
- 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

---

<sup>5</sup> Teplota 277 K byla stanovena jako nejnižší možná s ohledem na směsná rozpouštědla.



Obr. 8 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovanou čarou) a organických složek (plnou čarou) v okolí HA řetězce při 0.1M koncentraci soli a teplotě 277 K (RDF pro 310 K vycházely velmi podobně, proto zde ani nejsou uvedeny). Vzájemné poměry vody a organické složky jsou zde vyjádřeny jejím objemovým zlomkem. [127]

Kromě preference vody v bezprostřední blízkosti HA řetězce docházelo k separaci i v celém objemu simulačního boxu. Efekt byl podstatně výraznější u terc-butanolu, ale i u dioxanu docházelo k částečné separaci (viz 6.1.2). Ta byla způsobena termodynamickými procesy, především rozdílnými chemickými potenciály jednotlivých složek rozpouštědla.

Sodné ionty v okolí HA byly velmi silně a ve velkém množství přitahovány ke konkrétním místům řetězce. Tam pak narušovaly zpevňující intramolekulární vodíkové můstky, čímž zvyšovaly flexibilitu HA (zejména ve směsi voda:dioxan) a umožňovaly rotace kolem glykosidických vazeb mezi sacharidovými cykly.

Všechny 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“ [127].

#### 6.1.4 Interakce hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech

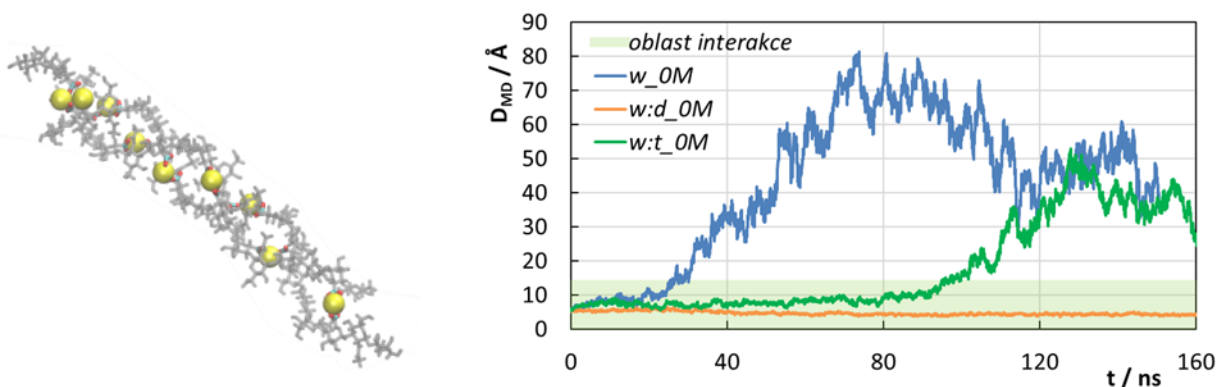
Pro simulace interakcí dvou kratších HA řetězců ve směsných rozpouštědlech (opět voda:dioxan a voda:terc-butanol) byly zvoleny koncentrace soli 0 M a 0.08 M. Poměr vody a organické složky byl v obou směsných rozpouštědlech 1:1 a i teplota byla tentokrát pouze jedna (298.15 K), čímž se simulace co nejvíce přiblížily podmínkám v praxi. 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 [72], že antiparalelní orientace je preferovanou konformací při případné interakci řetězců, a to nejen v čisté vodě.

Řetězce tentokrát nebyly fixovány, ale v případě separace byly opět manuálně přiblíženy k sobě<sup>6</sup>. Pro každý systém bylo napočítáno přes 70 ns (u řetězců s nízkou tendencí k separaci mnohdy i přes 200 ns a u systémů, kde došlo k formaci duplexu i 500 ns). Simulační box měl velikost cca  $(115 \text{ \AA})^3$  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).

Stejně jako v čisté vodě, bez přítomnosti soli nedocházelo ve směsných rozpouštědlech k žádné interakci ani po opakovaném přiblížení řetězců. Za přítomnosti NaCl došlo ve směsi vody a terc-butanolu k významnému nárůstu interakce (v porovnání s vodou) – to bylo podpořeno hlavně tím, že střední vzdálenost  $D_{MD}$  se pohybovala mezi 10 a 15 Å.

Výrazně nejvyšší míru vzájemné interakce mezi HA řetězci však vykazovaly systémy w:d\_0.08M. Vlivem iontů v blízkosti byl záporný náboj řetězců téměř kompletně neutralizován a narušení intramolekulárních vazeb dávalo bočním skupinám více příležitostí pro tvorbu vazeb intermolekulárních a to do takové míry, že byla dokonce pozorována samovolná formace **dvoušroubovice**. Její stabilitu zajišťovaly zejména HB a iontové mosty mezi karboxylovými skupinami, orientovanými směrem dovnitř do dutiny mezi řetězci (Obr. 9). Duplexní tvar si HA řetězce udržely po dobu několik stovek nanosekund a struktura byla přenesena (spolu s ionty v bezprostřední vzdálenosti do 1.5 Å) i do zbylých rozpouštědel, a také do ještě vyšší koncentrace NaCl – 0.15 M.



Obr. 9 – Dvoušroubovice vlevo je vizualizací systému a\_w:d\_0.08M, se zvýrazněnými iontovými mosty mezi karboxylovými skupinami. Graf vpravo ukazuje střední vzdálenost řetězců  $D_{MD}$  po přenesení antiparalelní šroubovice do systémů s 0M koncentrací soli. [128]

<sup>6</sup> Přiblížení bylo provedeno v programu VMD. Vlivem změny jejich konformací v průběhu simulací nebyla vzdálenost řetězců vždy stejná. Vždycky ale umožňovala řetězcům zahájit vzájemnou interakci.

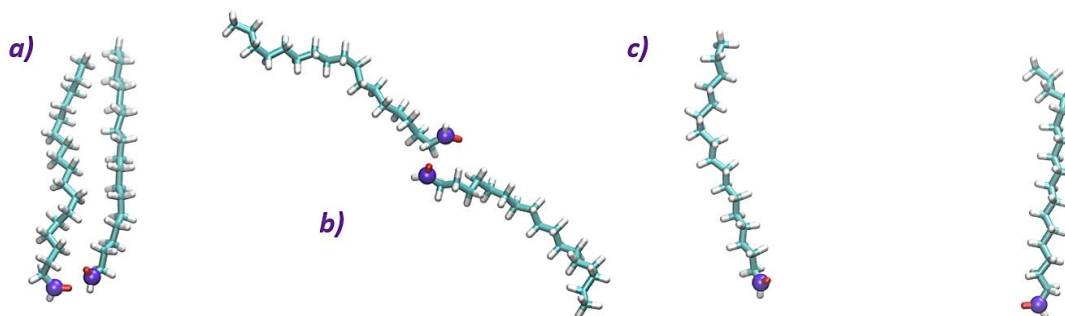
Ve vodném prostředí došlo k rozpadu struktury a separaci řetězců poměrně rychle, ale ve směsi a\_w:t\_0.15M vydržela dvoušroubovice přes 160 ns. V systémech s dioxanem se pak přesunem dokonce stabilizovala (jak potvrzuje i graf  $D_{MD}$  na Obr. 9) a stala se ještě pravidelnější, a to prakticky bez ohledu na koncentraci soli – dokonce i při 0 M NaCl byla šroubovice v dioxanové směsi velmi pravidelná.

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“ [128].

## 6.2 Simulace samostatných alifatických řetězců

V zájmu lepšího porozumění alifatickým substituentům byly tyto řetězce simulovány nejprve samostatně. Jelikož karboxylová skupina při esterifikaci HA zaniká, byly v těchto simulacích použity molekuly oktadekanalu. Simulovány byly samostatné řetězce, ale i jejich dvojice, vždy s pevně zafixovanou polohou jednoho z konců (konkrétně prvního uhlíku, na kterém se nachází kyslík). Počáteční umístění a vzájemná orientace dvojic řetězců pak byla stanovena následovně (viz Obr. 10):

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



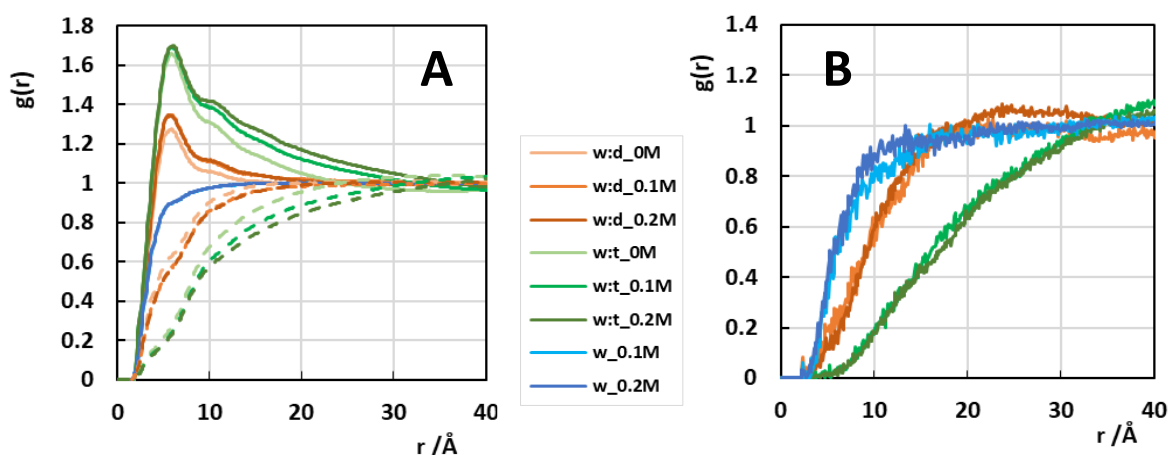
Obr. 10 – Počáteční orientace při simulaci aldehydových řetězců dle výše uvedeného rozdělení (fialovou barvou jsou znázorněny uhlíkové atomy s fixovanou polohou).

Každá z těchto variant byla simulována ve třech rozpouštědlech: čistá voda, směs voda:dioxan a směs voda:terc-butanol (v objemovém poměru 1:1) o třech různých

koncentracích NaCl (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.

### 6.2.1 Složení směsi v blízkosti alifatických řetězců

Mezi organickými molekulami a alifatickými řetězci docházelo k hydrofobní interakci. Tím výrazně narůstala tendence k fázové separaci směsných rozpouštědel, což potvrzuje i graf RDF na Obr. 11.



Obr. 11 – 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<sup>7</sup>.

Je vidět, že největší separace proběhla ve směsích s terc-butanolem, kde byl efekt hydrofobního vytlačení vody podpořen tvorbou mikrofází. Ty se orientovaly tak, aby se v okolí alifatických řetězců nacházely právě ty s převahou terc-butanolu. V dioxanu byla separace mírnější. Analýza množství  $\text{Na}^+$  v okolí řetězců (Obr. 11B) pak ukázala, že ionty preferovaly prostředí vody. V okamžiku fázové separace do mikrodomén se tak většina z nich soustředila do oblastí bohatších na vodu.

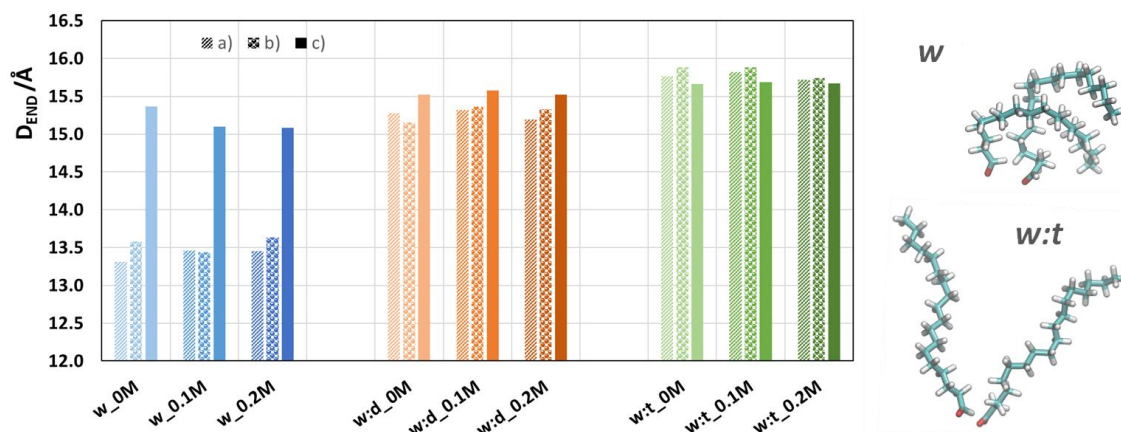
### 6.2.2 Ohebnost alifatických řetězců a jejich vzájemná interakce

Řetězce byly částečně ohýbány hydrofobní interakcí mezi jejich různými částmi, ale proti ní působil tepelný pohyb, který tato interakce nedokázala překonat. Mezi jednotlivými rozpouštědly se ohebnost příliš nelišila – nejvíce se řetězce

<sup>7</sup> RDF dvojic řetězců zde uvedeny nejsou, protože v jejich okolí se rozpouštědlo separovalo prakticky totožným způsobem a výsledné grafy tak byly téměř identické jako ty na Obr. 11.

ohýbaly ve vodě a nejméně v terc-butanolu, což odpovídá pořadí, danému permitivitou<sup>8</sup>. Rozdíly ve vzdálenosti jejich konců však nebyly velké.

U systémů, kde byly simulovány dva alifatické řetězce (Obr. 12), záležela ohebnost na jejich vzájemné poloze – pokud od sebe byly dostatečně vzdálené (systém ,c‘), ohebnost odpovídala hodnotám, napočítaným u samostatných řetězců.



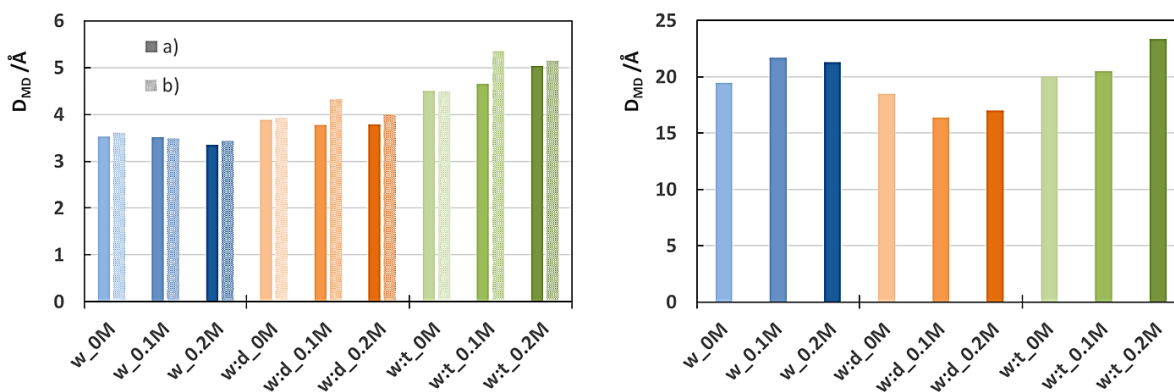
Obr. 12 – Srovnání vzdálenosti konců dvojic alifatických řetězců ( $D_{END}$ ), kdy pro každý systém se jedná o hodnotu vzdálenosti, zprůměrovanou z obou řetězců (vlevo). Vpravo: vizualizace stáčení dvojic řetězců v čisté vodě (w) a naopak jejich narovnání v terc-butanolové směsi (w:t).

U řetězců fixovaných v bezprostřední blízkosti (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 (viz Obr. 12) za účelem minimalizace rozhraní s vysoce polární vodou. Ve směsi vody a dioxanu byla hydrofobní interakce přítomností druhého řetězce také posílena, ale tento fakt se nijak výrazněji neprojevil na jejich ohebnosti. V terc-butanolových mikro-doménách pak sice docházelo k hydrofobní interakci, ale ne mezi alifatickými řetězci – ty se naopak vlivem terc-butanolu v okolí chovaly stejně, jako by byly v systému každý sám.

Ve střední vzdálenosti řetězců (Obr. 13) 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. V čisté vodném prostředí se kolem sebe řetězce obtáčely o něco více, což byl pravděpodobně důvod, proč na sebe tak dobře nedosáhly a jejich  $D_{MD}$  tak byla vyšší. Ve směsi s terc-

<sup>8</sup> 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.

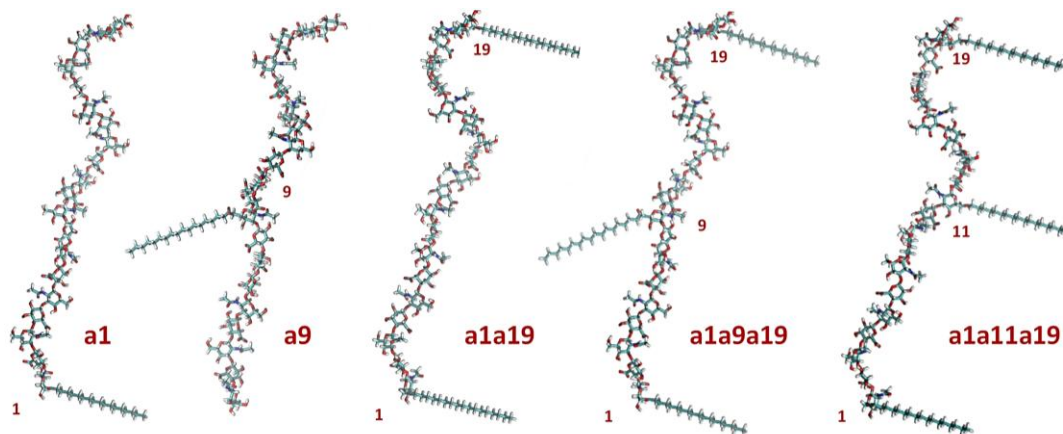
butanolem pak řetězce (stejně jako v systémech ‚a‘ a ‚b‘) preferovaly zůstat dál od sebe, obklopeny molekulami organické složky.



Obr. 13 – Střední vzdálenost řetězců ( $D_{MD}$ ) pro systémy **a**, **b** (vlevo) a **c** (vpravo).

### 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. 14). Všechny systémy byly opět simulovány ve vodě a 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). 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.

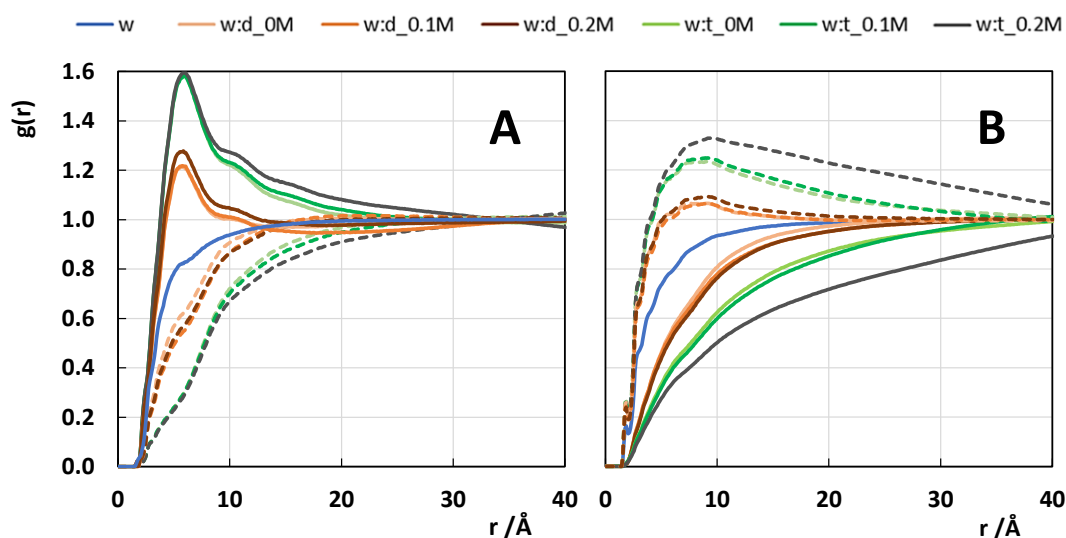


Obr. 14 – Varianty substituovaných systémů na počátku simulace, označených podle čísla sacharidového residua, na kterém jsou substituenty navázány.

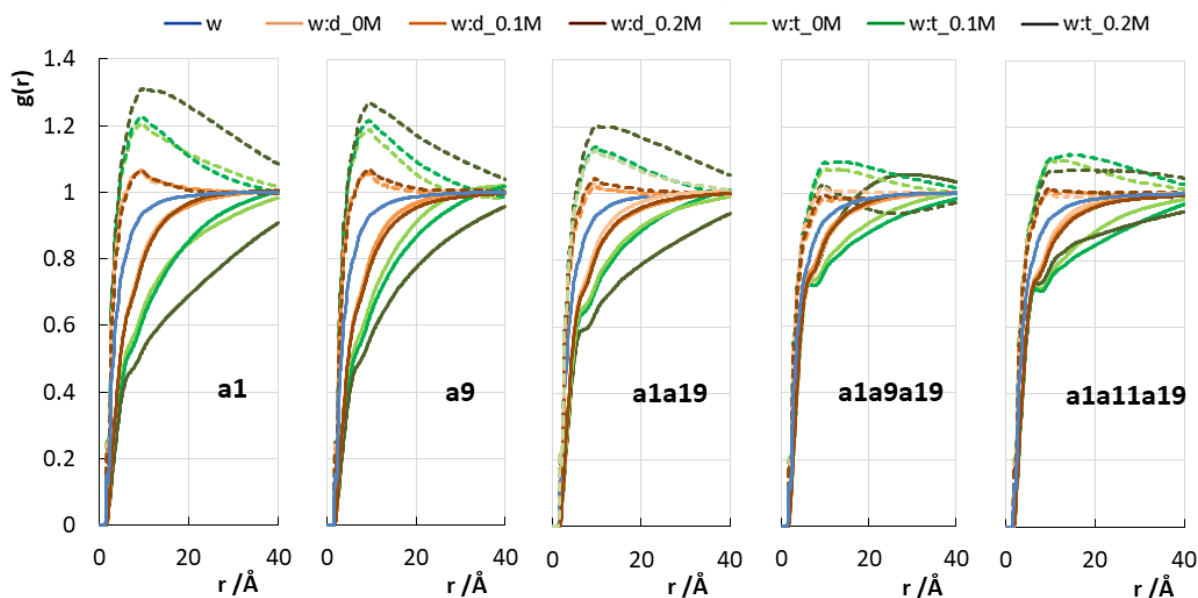
#### 6.3.1 Distribuce rozpouštědla v okolí substituovaných řetězců

Z vykreslení RDF rozpouštědla v okolí substituovaných řetězců (Obr. 15A) je patrné, že distribuce kolem substituentů má téměř totožný průběh jako distribuce

rozpouštědla kolem samostatných alifatických řetězců. Naopak rozložení molekul kolem páteře (Obr. 15B) se velmi podobalo RDF v blízkosti nesubstituovaných řetězců (viz Obr. 8), kdy v blízkosti HA výrazně převládala voda a organických molekul se zde nacházelo jen málo [127]. Tento rozdíl mezi RDF kolem páteře a substituentů byl zapříčiněn jejich hydrofobicitou, hydrofilitou páteře a s tím spojenou fázovou separací celého rozpouštědla, znatelně podpořenou přítomností sodné soli.



Obr. 15 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára) a organické složky (plná čára) v okolí substituentů na řetězci *ala19* (A) a v okolí jeho HA páteře (B).



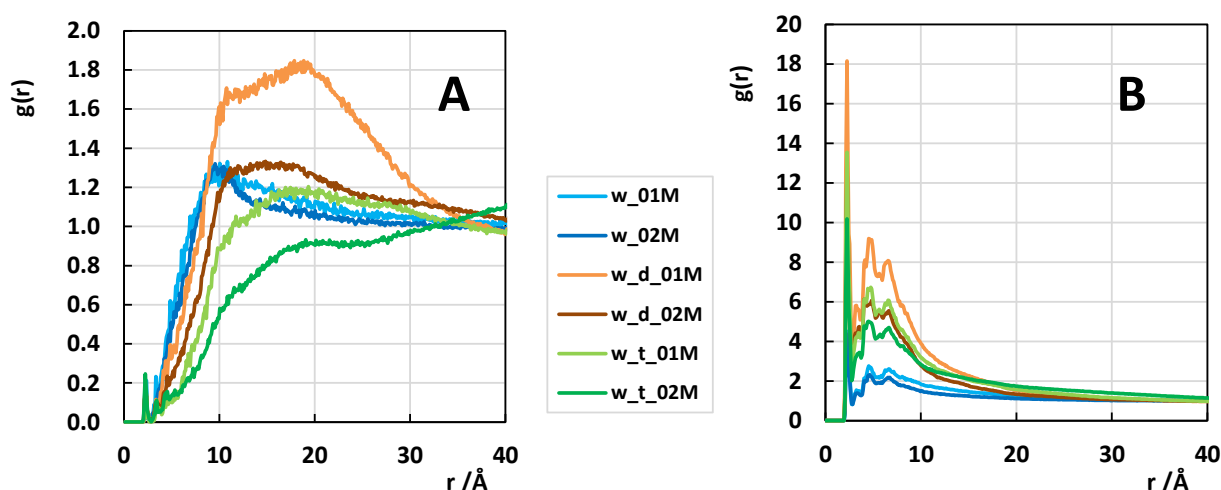
Obr. 16 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára) a organické složky (plná čára) v okolí celého řetězce pro všechny systémy substituované HA.

Při porovnání RDF vody a organické složky kolem jednotlivých substituovaných molekul (Obr. 16) je vidět, že v celkovém součtu převažuje v okolí řetězců voda –

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. 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.

### 6.3.2 Distribuce iontů v okolí substituovaných řetězců

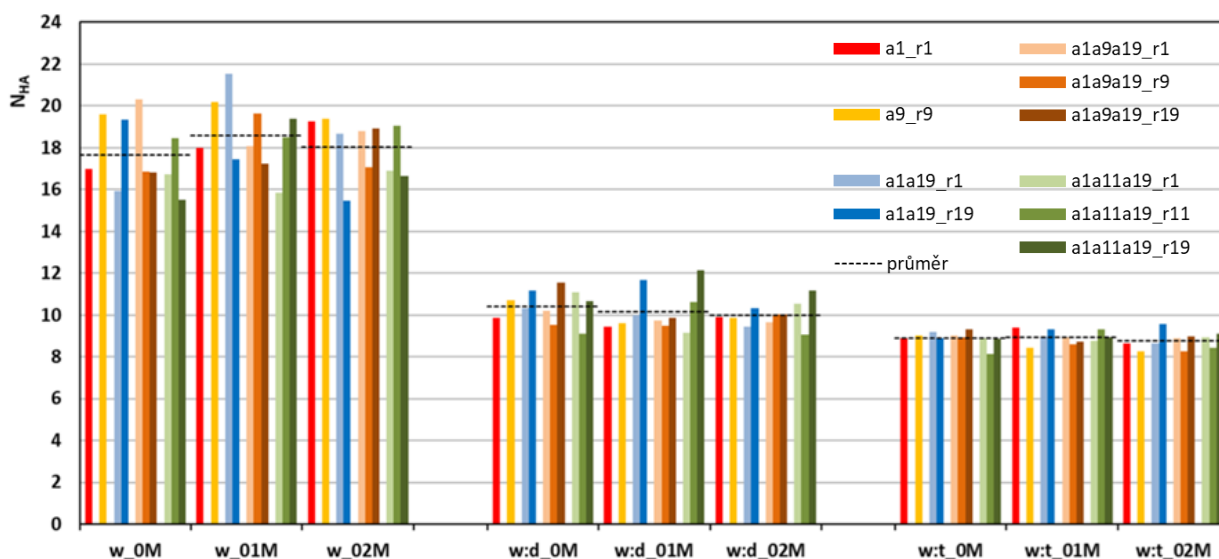
Jednoznačně nejvíce iontů se v blízkosti řetězců (Obr. 17) nacházelo za přítomnosti dioxanu (kde byly přitahovány převážně elektrostaticky), konkrétně při 0.1M koncentraci soli. Z podstatně mírnějšího průběhu křivek w:d\_0.2M je možné usuzovat, že existuje jistá hraniční koncentrace, nad kterou už si ionty vzájemně překáží, dochází ke vzájemnému odpuzování a jejich efekty se navzájem vyruší (podobně jako nad 0.6M koncentrací u nesubstituovaných řetězců v čisté vodě [72]).



Obr. 17 – Radiální distribuční funkce sodných iontů v okolí substituentů na řetězci a1a19 (A) a v okolí jeho HA páteře (B) pro nenulové koncentrace soli.

### 6.3.3 Orientace substituentů v prostoru

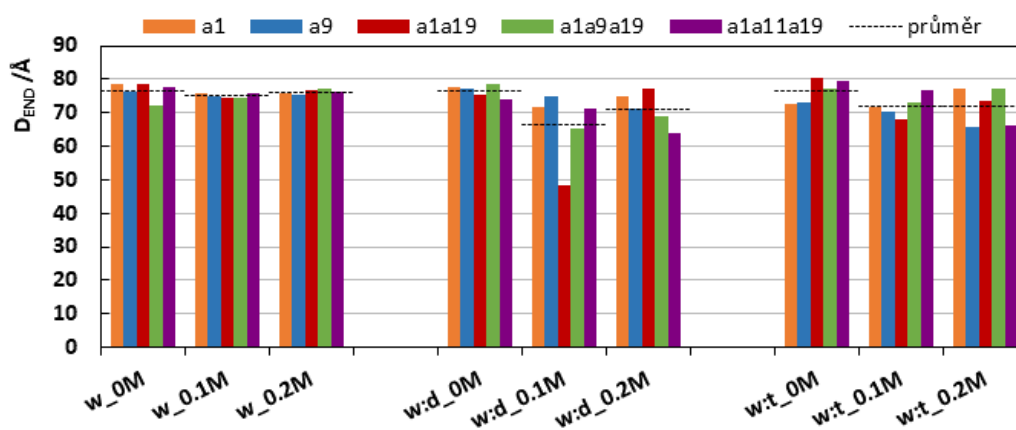
Vyšetření orientace substituentů bylo prováděno analýzou počtu atomů HA řetězce ( $N_{HA}$ ) do 4 Å od alifatických zbytků (Obr. 18). Zatímco ve směsných rozpouštědlech substituenty preferovaly interakci s molekulami organické složky a v blízkosti HA řetězce se tak nacházela jen malá část substituentu, naopak ve vodě měly řetězce kvůli své hydrofobicitě tendenci zůstat spíše v blízkosti HA páteře. Z grafu je dále vidět mírný rozdíl mezi dioxanovou a terc-butanolovou směsí, pravděpodobně způsobený velkou afinitou substituentů k terc-butanolovým mikrofázím.



Obr. 18 – Přehled počtu atomů HA v blízkosti jednotlivých substituentů ( $N_{HA}$ ), označených dle monosacharidového residua, na kterém se nacházely, vč. průměru, znázorněného černě. Odchytky nejsou uvedeny, jelikož byly řádově menší než zobrazené hodnoty.

### 6.3.4 Vliv substituentů na ohebnost řetězců

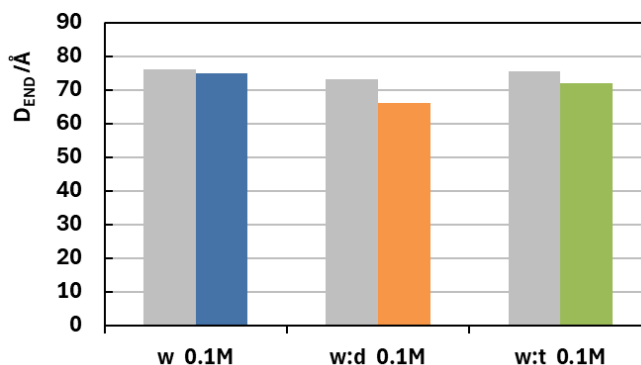
Ohebnost řetězců byla opět posuzována pomocí měření vzdálenosti konců HA páteře (Obr. 19). Její průměrná hodnota se v čisté vodě pohybovala kolem 76 Å (konturová délka dekameru HA je přibližně 100 Å) téměř bez ohledu na koncentraci soli. Stejnou hodnotu  $D_{END}$  vykazovaly dokonce i řetězce ve směsných rozpouštědlech s 0M koncentrací NaCl, zatímco za přítomnosti soli byla vzdálenost konců ve směsných rozpouštědlech výrazně nižší.



Obr. 19 – Vzdálenost konců ( $D_{END}$ ) různě substituovaných řetězců HA.

Vliv substituentů na ohebnost se nejvíce projevoval u vícečetně substituovaných systémů. Zatímco na narovnaném řetězci byla jakákoliv interakce mezi substituenty

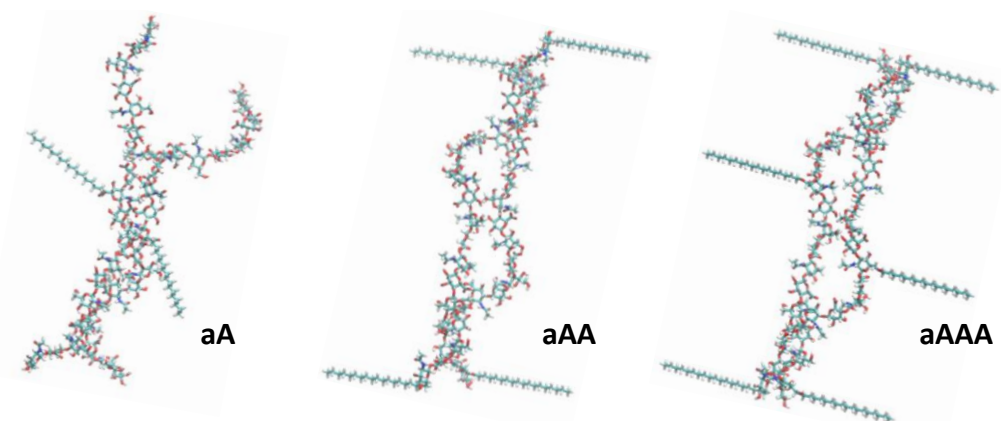
nížká, následkem ohybu páteře a s tím souvisejícím přiblížením, mezi nimi mohlo docházet ke krátkodobé hydrofobní interakci (a jejím vlivem pak i k dalšímu ohýbání). Při srovnání vzdálenosti konců nesubstituovaných a substituovaných řetězců (Obr. 20), je patrné, že se substituované řetězce u všech pozorovaných systémů ohýbaly o něco více, než ty nesubstituované.



Obr. 20 – Průměrná vzdálenost konců ( $D_{END}$ ) nesubstituovaných (šedé sloupce) a substituovaných řetězců HA (barevné sloupce) při 0.1M koncentraci NaCl<sup>9</sup>. Odchytky nejsou uvedeny, jelikož byly řádově menší než zobrazené hodnoty.

## 6.4 Simulace dvou substituovaných řetězců HA

Pro simulaci interakcí více substituovaných řetězců byly vybrány systémy a9, a1a19 a a1a11a19 (zkratky vysvětleny na Obr. 14), dále označované jako aA, aAA a aAAA (Obr. 21).



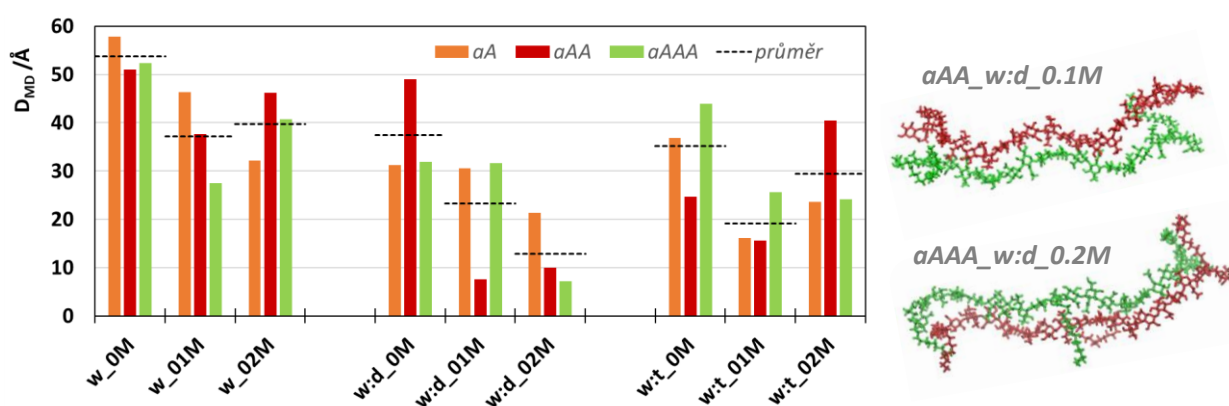
Obr. 21 – Počáteční konformace dvojic substituovaných řetězců.

<sup>9</sup> 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.

Řetězce byly navzájem orientovány antiparalelně, opět bylo provedeno přes 200 ns simulací a to ve všech variantách rozpouštědel (čistá voda, w:d i w:t při 0M, 0.1M a 0.2M koncentrací soli). Velikost simulačního boxu byla  $(120 \text{ \AA})^3$  a mimo HA a iontů se zde nacházelo 27 200 molekul vody na 4 900–5 300 molekul organické složky.

### 6.4.1 Afinita substituovaných hyaluronanových řetězců

Kvůli substituentům se řetězce ve většině systémů nedostaly do takové blízkosti, jako řetězce nesubstituované. Mimo to byla jejich střední vzdálenost (Obr. 22) silně ovlivněna také volbou rozpouštědla a koncentrací soli.

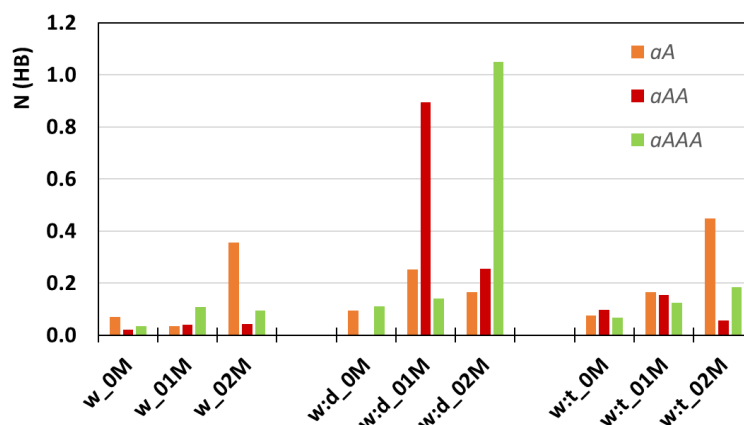


Obr. 22 – Přehled průměrné střední vzdálenosti mezi substituovanými HA řetězci (vlevo) a vizualizace systémů, které se k sobě nejvíce přiblížily (vpravo).

V čisté vodě se k sobě řetězce krátkodobě přibližovaly pouze za přítomnosti soli a po pár desítkách nanosekund opět docházelo k separaci. Ve směsi w:d zůstávaly řetězce ve vzájemné blízkosti podstatně déle (např. po celou délku simulace), což podpořila formace iontových mostů. I ve směsi s terc-butanolem se řetězce nacházely podstatně blíž než ve vodě, pravděpodobně vlivem sdílení mikrodomén mezi řetězci.

### 6.4.2 Typy interakcí mezi substituovanými řetězci

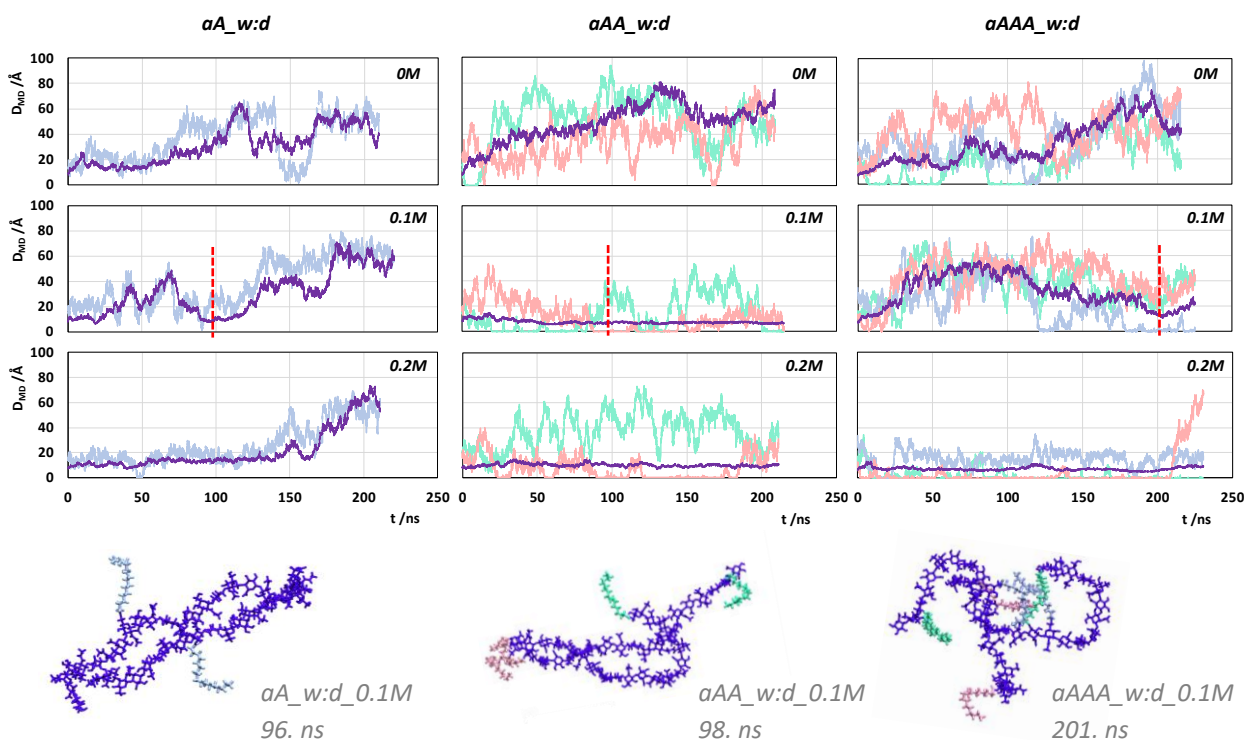
Ve chvílích, kdy se řetězce dostaly do vzájemné blízkosti, byla jejich interakce zprostředkovávána vodíkovými, vodními a iontovými mosty. Ty se nejčastěji formovaly ve směsích vody a dioxanu (za nenulové koncentrace NaCl) a obvykle jejich přítomnost znamenala i přítomnost vodních mostů, byť těch většinou nebylo moc, a vodíkových vazeb (Obr. 23). Ty také nejčastěji vznikaly ve směsích s dioxanem. Nacházely se sice i v systémech s terc-butanolem, ale bylo jich výrazně méně. Ve vodě se pak řetězce poměrně rychle vzdálily od sebe, čímž byla tvorba HB téměř znemožněna.



Obr. 23 – Průměrný počet vodíkových vazeb na jeden krok simulace.

### 6.4.3 Interakce alifatických substituentů

Vliv substituentů na interakci HA řetězců byl komplexní – vlivem sterických faktorů se HA řetězce nemohly tolik přibližovat, naopak hydrofobní interakce substituentů interakci podporovala. Při srovnání časového vývoje střední vzdálenosti řetězců (Obr. 24), závisel průběh křivek na četnosti substituce.



Obr. 24 – 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 (růžově). Ve spodní části obrázku jsou zachyceny snímky vybraných systémů (časový bod jejich pořízení je v grafech označen červenou čarou).

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. V případě trojnásobně substituovaných HA zůstávaly řetězce jen málokdy v původní antiparalelní poloze (viz systém aAAA\_w:d\_0.1M ve spodní části obrázku).

Dynamika dvojic substituovaných HA řetězců a míra jejich vzájemné interakce tedy významně závisela na prostředí, ve kterém byly simulovány, ale také na množství a umístění alifatických substituentů (v praxi řízeno právě prostředím). Regulací tohoto prostředí by tak mělo být možné ovlivnit nejen míru substituce a její pravidelnost, ale 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 projevovala 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 zpevnované

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<sup>+</sup> 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. Hrnčířik, 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](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 <sup>13</sup>C 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 <sup>1</sup>H 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. Ponižil, 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] 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>.
- [50] 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).
- [51] 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>.
- [52] 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>.
- [53] 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>.
- [54] 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>.
- [55] T.M. Tamer, Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing, *Interdiscip Toxicol* 6 (2013) 111. <https://doi.org/10.2478/INTOX-2013-0019>.
- [56] 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>.
- [57] 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>.
- [58] 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>.
- [59] 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>.

- [60] 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>.
- [61] 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>.
- [62] 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>.
- [63] 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).
- [64] 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>.
- [65] 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>.
- [66] 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>.
- [67] 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>.
- [68] 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>.
- [69] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Vet Med (Praha)* 53 (2008) 397–411.
- [70] 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>.
- [71] E.A. Balazs, T.C. Laurent, R.W. Jeanloz, Nomenclature of hyaluronic acid, *Biochem J* 235 (1986) 903. <https://doi.org/10.1042/BJ2350903>.
- [72] A. Kolaříková, E. Kutáľková, 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>.
- [73] 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).
- [74] 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>.
- [75] 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).
- [76] 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>.
- [77] 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>.
- [78] 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](https://doi.org/10.1021/JA104077N/ASSET/IMAGES/LARGE/JA-2010-04077N_0002.JPEG).
- [79] 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](https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.9B00982/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2019-00982F_0006.JPEG).
- [80] 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).
- [81] R. Mendichi, A.G. Schieron, 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).
- [82] 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>.
- [83] 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).

- [84] 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).
- [85] 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).
- [86] 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).
- [87] 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](https://doi.org/10.1021/BM900108Z/ASSET/IMAGES/LARGE/BM-2009-00108Z_0011.JPEG).
- [88] 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>.
- [89] E. Kutálková, 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>.
- [90] 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>.
- [91] 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>.
- [92] 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>.
- [93] 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>.
- [94] 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>.
- [95] 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>.

- [96] 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).
- [97] 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>.
- [98] 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>.
- [99] 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>.
- [100] 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>.
- [101] 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>.
- [102] 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>.
- [103] 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>.
- [104] 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>.
- [105] 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](https://doi.org/10.1021/JA01302A051/ASSET/JA01302A051.FP.PNG_V03).
- [106] D. McGregor, Tertiary-Butanol: A toxicological review, *Crit Rev Toxicol* 40 (2010) 697–727. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.494249>.
- [107] tert-Butanol | (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COH | CID 6386 - PubChem, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6386> (accessed May 8, 2024).

- [108] 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>.
- [109] 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>.
- [110] 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>.
- [111] 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>.
- [112] 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>.
- [113] 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>.
- [114] 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>.
- [115] 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](https://doi.org/10.1021/JA9621760/SUPPL_FILE/JA11225.PDF).
- [116] 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).
- [117] 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>.
- [118] NAMD - Scalable Molecular Dynamics, (n.d.). <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/> (accessed May 11, 2024).
- [119] 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).
- [120] 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>.

- [121] 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](https://doi.org/10.1021/J100308A038/ASSET/J100308A038.FP.PNG_V03).
- [122] S. Izadi, R. Anandakrishnan, 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](https://doi.org/10.1021/JZ501780A/SUPPL_FILE/JZ501780A_SI_001.PDF).
- [123] 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>.
- [124] Home — Spyder IDE, (n.d.). <https://www.spyder-ide.org/> (accessed May 11, 2024).
- [125] MDAnalysis · MDAnalysis, (n.d.). <https://www.mdanalysis.org/> (accessed May 21, 2024).
- [126] 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>.
- [127] E. Kutáľková, 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, *Carbohydr Polym* 304 (2023) 120506.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120506>.
- [128] A. Kolaříková, E. Kutáľková, 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>.
- [129] 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). [69]</i> .....	12
<i>Obr. 2 – Struktura 1,4-dioxanu (a) a jeho vizualizace v MD simulaci (b).</i> .....	16
<i>Obr. 3 – Struktura terc-butanolu (a) a jeho vyobrazení v simulaci (b).</i> .....	16
<i>Obr. 4 – Ilustrace referenčních a skutečných řetězců, pro výpočet jejich střední vzdálenosti podle rovnice (3) a matematického postupu, popsání v bodech 1–3. Modré body představují jednotlivé atomy, červené a fialové vzdálenosti <math>r_{ij}</math> představují rozdíl <math>r_i - r_j</math>. [72]</i> .....	21
<i>Obr. 5 – Detail fixace pozice řetězců, kdy fixované atomy jsou zvětšeny a znázorněny černou barvou. [72]</i> .....	22
<i>Obr. 6 – Četnost vodíkových vazeb (červeně) a vodních (modře) a iontových (žlutě) mostů v různě koncentrovaných vodných roztocích NaCl za dvou různých teplot. [72]</i> .....	22
<i>Obr. 7 – Vypočítané KBI pro směs vody a dioxanu (znázorněno body), ve srovnání s experimentálními výsledky (znázorněny plnou čarou), kde <math>x</math> představuje molární zlomek dioxanu. KBI pro interakci vody s vodou (<math>G_{vv}</math>) je znázorněno modře, interakce vody a dioxanu (<math>G_{vd}</math>) zeleně a interakce dioxanu s dioxanem (<math>G_{dd}</math>) červeně. Tyrkysová barva naznačuje výsledky <math>G_{vv}</math> bez dodatečných korekcí. [126]</i> .....	23
<i>Obr. 8 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovanou čarou) a organických složek (plnou čarou) v okolí HA řetězce při 0.1M koncentraci soli a teplotě 277 K (RDF pro 310 K vycházely velmi podobně, proto zde ani nejsou uvedeny). Vzájemné poměry vody a organické složky jsou zde vyjádřeny jejím objemovým zlomkem. [127]</i> .....	25
<i>Obr. 9 – Dvoušroubovice vlevo je vizualizací systému <math>a_w:d_0.08M</math>, se zvýrazněnými iontovými mosty mezi karboxylovými skupinami. Graf vpravo ukazuje střední vzdálenost řetězců <math>D_{MD}</math> po přenesení antiparalelní šroubovice do systémů s 0M koncentrací soli. [128]</i> .....	26
<i>Obr. 10 – Počáteční orientace při simulaci aldehydových řetězců dle výše uvedeného rozdělení (fialovou barvou jsou znázorněny uhlíkové atomy s fixovanou polohou).</i> .....	27
<i>Obr. 11 – 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> .....	28
<i>Obr. 12 – Srovnání vzdálenosti konců dvojic alifatických řetězců (<math>D_{END}</math>), kdy pro každý systém se jedná o hodnotu vzdálenosti, zprůměrovanou z obou řetězců</i>	

<i>(vlevo). Vpravo: vizualizace stáčení dvojic řetězců v čisté vodě (w) a naopak jejich narovnání v terc-butanolové směsi (w:t).</i> .....	29
<i>Obr. 13 – Střední vzdálenost řetězců (<math>D_{MD}</math>) pro systémy a, b (vlevo) a c (vpravo).</i> .....	30
<i>Obr. 14 – Varianty substituovaných systémů na počátku simulace, označených podle čísla sacharidového residua, na kterém jsou substituenty navázány.</i> .....	30
<i>Obr. 15 – 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> .....	31
<i>Obr. 16 – Radiální distribuční funkce vody (přerušovaná čára) a organické složky (plná čára) v okolí celého řetězce pro všechny systémy substituované HA.</i> .....	31
<i>Obr. 17 – Radiální distribuční funkce sodných iontů v okolí substituentů na řetězci a1a19 (A) a v okolí jeho HA páteře (B) pro nenulové koncentrace soli.</i> .....	32
<i>Obr. 18 – Přehled počtu atomů HA v blízkosti jednotlivých substituentů (<math>N_{HA}</math>), označených dle monosacharidového residua, na kterém se nacházely, vč. průměru, znázorněného černě. Odchytky nejsou uvedeny, jelikož byly řádově menší než zobrazené hodnoty.</i> .....	33
<i>Obr. 19 – Vzdálenost konců (<math>D_{END}</math>) různě substituovaných řetězců HA.</i> .....	33
<i>Obr. 20 – Průměrná vzdálenost konců (<math>D_{END}</math>) 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> .....	34
<i>Obr. 21 – Počáteční konformace dvojic substituovaných řetězců.</i> .....	34
<i>Obr. 22 – Přehled průměrné střední vzdálenosti mezi substituovanými HA řetězci (vlevo) a vizualizace systémů, které se k sobě nejvíce přiblížily (vpravo).</i> .....	35
<i>Obr. 23 – Průměrný počet vodíkových vazeb na jeden krok simulace.</i> .....	36
<i>Obr. 24 – Časový vývoj střední vzdálenosti (<math>D_{MD}</math>) substituovaných řetězců (fialově) ve směsném rozpouštědle voda:dioxan, <math>D_{MD}</math> mezi substituenty na r9 (modře), substituenty na r1 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 porizení je v grafech označen červenou čarou).</i> .....	36

## Seznam tabulek

<i>Tab. 1 – V textu používané značení simulačních prostředí</i> .....	18
---	----

## 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)
GCU nebo G <sub>-</sub>	kyselina β-D-glukuronová
GROMOS	GRONingen MOlecular Simulation
HA	kyselina hyaluronová resp. hyaluronan
HB	vodíkové můstky
CHARMM	Chemistry at HaRvard Macromolecular Mechanics
Ibr	Iontové mosty
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KBI	Kirkwood-Buffovy integrály
MD	molekulová dynamika
NAG nebo N <sub>-</sub>	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, Ph.D.**  
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: Základy programování, Mechanika a molekulová fyzika, Elektřina a magnetismus, Úvod do fyziky mikrosvěta a Elektrodynamika a teorie relativity
- 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

## Zahraniční 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

Ing. Alena Kolaříková, Ph.D.

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

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

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Ing. Alena Kolaříková, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2025

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-349-2

