

Studium interakcí hyaluronan-hyaluronan metodou molekulové dynamiky

Alena Kolaříková

Bakalářská práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Alena Kolaříková**
Osobní číslo: **T16374**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium interakcí hyaluronan-hyaluronan metodou molekulové dynamiky (virtuální experiment)**

Zásady pro vypracování:

Molekulová dynamika se zabývá simulováním systémů s velkým počtem stupňů volnosti na základě numerického řešení pohybových rovnic jednotlivých atomů. Velmi vhodné jsou například pro zkoumání struktury a vlastností makromolekul. Cílem práce je popsat interakce hyaluronan-hyaluronan, případně jejich teplotní závislost či míru vlivu koncentrace iontů rozpuštěných ve vodě, na základě simulací v programu NAMD.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Jungwirth P., *Molekuly a ionty v pohybu: Počítačové simulace biochemických a biofyzikálních procesů*. **Chem. Listy** 108, 278–284 (2014).

[2] Almond A., *Multiscale modeling of glycosaminoglycan structure and dynamics: current methods and challenges*. **Current Opinion in Structural Biology** 50, 58–64 (2018).

[3] Blundell Ch. D., DeAngelis P., Almond A., *Hyaluronan: the absence of amide-carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models*. **Biochem. J.** 396, 487–498 (2006).

[4] Almond A., Sheehen J. K., Brass A., *Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution*. **Glycobiology** 7, 597–604 (1997).

[5] Scott J. E., Cummings Ch., Brass A., Chen Y., *Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation*. **Biochem. J.** 274, 699–705 (1991).

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Eva Kutálková, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

2. ledna 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

17. května 2019

Ve Zlíně dne 25. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 13.5.2019

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlédnutí veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá vzájemnými interakcemi dvou řetězců hyaluronanu ve vodném prostředí o různých koncentracích chloridu sodného prostřednictvím softwaru pro molekulovou dynamiku NAMD. Teoretická část práce pojednává o kyselině hyaluronové, popisuje princip molekulové dynamiky a jak může být při studiu kyseliny hyaluronové přínosná, a shrnuje poznatky z předchozích podobných zkoumání. V rámci praktické části je pak na dvou různých modelech – řetězce zcela volné a řetězce fixované v místech, kde se mezi nimi spontánně tvoří vodíkové vazby – při teplotě 275 K a různých koncentracích soli zkoumána četnost intermolekulárních vodíkových vazeb a vliv sodných iontů a molekul vody na tyto vazby.

Klíčová slova: molekulová dynamika, virtuální simulace, hyaluronan, vodíková vazba

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with interactions of two chains of hyaluronan in an aqueous solution with various concentrations of sodium chloride by means of NAMD – software for molecular dynamics studies. The theoretical part of the thesis deals with hyaluronic acid, describes the principle of molecular dynamics and how it can be useful in the study of hyaluronic acid, and summarizes the findings from previous similar investigations. In the practical part, the frequency of intermolecular hydrogen bonds and the influence of sodium ions and water molecules on these bonds are examined on two different models – chains completely free and chains fixed in places where hydrogen bonds are spontaneously formed – at a constant temperature of 275 K and at various salt concentrations of NaCl.

Keywords: molecular dynamics, virtual simulations, hyaluronan, hydrogen bond

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé práce RNDr. Evě Kutálkové, Ph.D. za její nadšení, sdílení zkušeností a spoustu času, který mně i mé práci věnovala.

Také bych ráda poděkovala Národní Gridové Infrastruktuře Metacentrum, že mi dovolila přístup k výpočetním a úložným zařízením za podpory projektů CERIT Scientific Cloud (LM2015085) a CESNET (LM2015042) financovaných z programu MŠMT Projekty velkých infrastruktur pro VaVaI.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	4
I TEORETICKÁ ČÁST	5
1 KYSELINA HYALURONOVÁ	6
1.1 STRUKTURA	6
1.2 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ	7
2 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA	9
2.1 PRINCIP A VYUŽITÍ.....	9
2.2 SOFTWARE NAMD A VMD	13
3 PŘEDCHOZÍ SIMULACE HYALURONANU	15
3.1 VODÍKOVÉ VAZBY	15
3.2 VLIV IONTŮ NA STRUKTURU	15
3.3 VLIV VODY NA STRUKTURU.....	16
II PRAKTICKÁ ČÁST	17
4 ZKOUMANÝ SYSTÉM A POUŽITÉ METODY	18
5 FIXOVANÉ ŘETĚZCE	21
5.1 INTERAKCE MEZI ŘETĚZCI	21
5.2 VLIV IONTŮ NA INTERAKCI ŘETĚZCŮ	24
5.3 VLIV VODY NA INTERAKCI ŘETĚZCŮ.....	25
6 NEFIXOVANÉ ŘETĚZCE	27
6.1 SROVNÁNÍ S FIXOVANÝMI ŘETĚZCI	27
6.2 SROVNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH KONCENTRACÍ SOLI	31
ZÁVĚR	35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41
SEZNAM TABULEK	43

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární lineární biopolysacharid. Byla objevena ve 30. letech minulého století a od té doby se hojně uplatňuje ve vědě. V přirozené formě polyanionu se nachází v tělech lidí, zvířat, vlastně prakticky všech živých organismů, kde hraje velmi důležitou roli. I díky jejím specifickým viskoelastickým vlastnostem a velmi nízké toxicitě s ní bylo od doby jejího objevu prováděno mnoho experimentů.

Posledních pár desetiletí se vlivem rozkvětu počítačových technologií kyselina hyaluronová zkoumá i pomocí metod molekulové dynamiky. Ta se zabývá simulováním fyzikálně-chemických systémů o velkém počtu stupňů volnosti na základě numerického řešení pohybových rovnic jejich jednotlivých atomů. Metody molekulové dynamiky nejsou finančně ani časově náročné a jsou tak výhodným doplňkem reálných experimentů. Navíc umožňují získat náhled do struktury látky a to i za extrémních podmínek.

V současné době je kyselina hyaluronová velmi populární – využívá se do kosmetických přípravků, ve farmaceutickém průmyslu, zkoumá se její využití v lékařství a tkáňovém inženýrství, nebo třeba ve výzkumu protirakovinné léčby. Její potenciál je však mnohem větší, jelikož je toho ještě spousta, co se o ní neví a je potřeba zjistit.

Tato bakalářská práce se zabývá simulacemi vzájemných interakcí dvou řetězců hyaluronanu pomocí softwarů molekulové dynamiky VMD a NAMD. Hlavním cílem práce je zkoumat závislost počtu míst, ve kterých se tvoří vodíkové vazby mezi řetězci hyaluronanů, na koncentraci soli v okolní vodě. Dále potom tato místa popsat a zhodnotit vliv sodných iontů na tvorbu vodíkových vazeb, a to jednak lokálně v konkrétních místech, ale i globálně jako vliv koncentrace iontů na jejich celkový počet.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

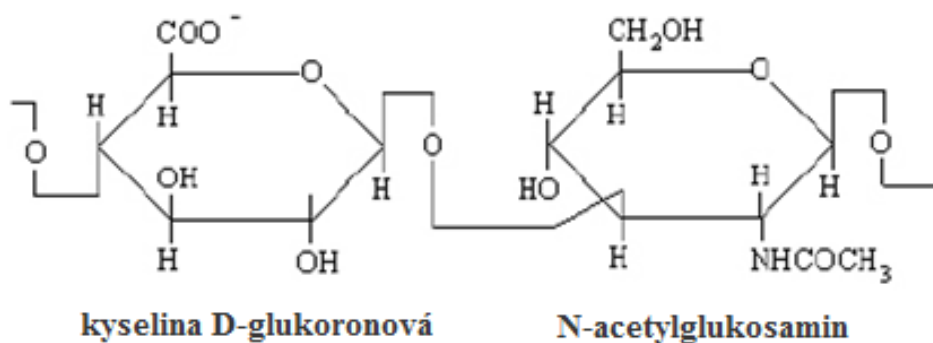
Kyselina hyaluronová (HA) je vysokomolekulární lineární biopolysacharid [1]. Byla objevena r. 1934 německým biochemikem Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem přibližně padesát let po prvních zmínkách o složce sklivce, která se chová odlišně od ostatních [2].

Nachází se nejen v tělech lidí a zvířat, ale ve všech živých organismech. Zde se obvykle vyskytuje v ionizované formě polyanionu (v tomto případě hyaluronanu) [1].

Tato biologicky aktivní molekula hraje v těle důležitou roli. Mezi funkce HA patří udržování elastoviskozity kapalných pojivových tkání (jako je synoviální tekutina nebo oční sklivce), kontrola hydratace a transport [1]. Dále hraje prostřednictvím interakce s proteiny a proteoglykanem klíčovou organizační roli ve vlastnostech mnoha extracelulárních matic, jako je třeba chrupavka [2]. Také při mitóze [3] a vývoji nádorů (i díky ní se dá vysledovat, v jakém je nádor stadiu) [4]. Podílí se i na důležitých procesech buněčné adheze, proliferace a migrace [5]. Významné množství HA se také vyskytuje v plicích, ledvinách, mozku a svalových tkáních [1].

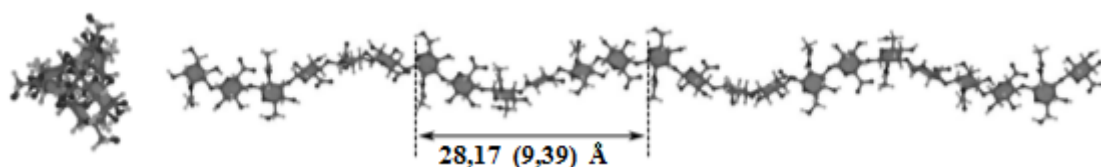
1.1 Struktura

Chemicky je HA přírodní polysacharid složený z opakujících se jednotek kyseliny β -D-glukuronové (GCU) a β -D-N-acetylglukosaminu (NAG), kdy mezi monomerními jednotkami se střídají beta-1,4 a beta-1,3 glykosidické vazby (viz Obr. 1) [6].



Obr. 1 – Chemická struktura hyaluronanu [1]

Oba monomerní cukry jsou prostorově příbuzné s glukózou, která v beta konfiguraci umožňuje, aby všechny její objemné skupiny (hydroxylové skupiny, karboxylátová část a anomerní uhlík na sousedním cukru) byly ve stericky příznivých polohách, zatímco všechny malé atomy vodíku obsadily méně stericky výhodné axiální polohy [1]. Výsledná struktura takového čistého roztoku disacharidu je pak energeticky velmi stabilní a je blízká trojnásobné levostranné šroubovici se stoupáním 28,17 Å na jeden závit a 9,39 Å na disacharid (viz Obr. 2). Podle simulačních dat jsou navíc molekuly HA ještě zpevněny sítí dočasných intramolekulárních vodíkových vazeb na lokální úrovni [7]. Na globální úrovni však HA vzájemně nijak významně neinteraguje.



Obr. 2 – Trojnásobná levostranná šroubovice HA [7]

V roztoku přebírá řetězec hyaluronanu formu expandovaného náhodného klubka. Kostra molekuly HA je pak zpevněna kombinací chemické struktury disacharidu a výše zmiňovaných intramolekulárních vodíkových vazeb. Naopak narušovat ji bude interakce s rozpouštědlem [1].

1.2 Vlastnosti a využití

HA je polyelektrolyt, ve fyziologických podmínkách prakticky plně disociovaný. V přírodě je jednou z nejvíce hydrofilních molekul [1]. Ve vodném prostředí vytváří vysoce nabobtnaná náhodná klubka, jejichž tvar a rozměry jsou ovlivněny složením roztoku [6]. Přítomnost kationtů (a iontů obecně) totiž silně ovlivňuje její konformaci i fyzikální vlastnosti. Například s rostoucí koncentrací sodíku se zvyšuje viskozita a s přítomností jednotlivých typů iontů se mírně mění i konformace šroubovice [8].

Chování HA v roztoku je i při nízké koncentraci velmi daleko od ideálního newtonského, protože má velmi výrazné viskoelastické vlastnosti [2] [7]. Reologické vlastnosti roztoků HA by se dokonce daly označit jako mimořádné, což je činí ideální jako mazadla. Hyaluronany proto oddělují většinu téměř přiléhajících tkáňových povrchů [1].

Z lékařského hlediska je důležité, že HA je v čisté formě neimunogenní, neantigenní, podle doposud provedených studií se zdá, že není nijak toxická, má jedinečné viskoelastické vlastnosti a vykazuje klíčové role v buněčné diferenciaci a motilitě [7].

HA se používá už více než 30 let v mnoha výrobcích po celém světě. Díky své biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a snadno modifikované chemické struktuře je předmětem zájmu farmaceutického i kosmetického průmyslu [6]. Její konzistence a biokompatibilita umožňuje, aby byla použita ve výrobcích pro péči o pleť jako vynikající zvlhčovač [1].

Jelikož HA je přirozeně přítomna ve vysokých koncentracích v kůži a měkkých pojivových tkáních, je vhodnou volbou pro matrici podporující regeneraci a augmentaci kůže, obvykle ve formě hydrogelů. Také se aplikuje při ortopedických operacích jako mazivo a byla zkoumána jako nosič léku pro různé cesty podání, včetně očních, nosních, plicních, parenterálních a lokálních [9]. I v dalších oblastech se objevuje stále větší zájem o výzkum tohoto polysacharidu [2].

V poslední době se pak, i přes to, že její účinnost v tomto směru nebyla nikdy zcela prokázána, využívá také do všemožných krémů, případně injekčních procedur, určených k omlazování pleti a vyhlazování vrásek, což ji činí v očích veřejnosti velmi populární.

2 MOLEKULOVÁ DYNAMIKA

Molekulárně-mechanická molekulová dynamika (MD) je technika počítačové simulace, schopná na základě pohybových rovnic množiny interagujících atomů popsat jejich další časový vývoj, který je počáteční množinou pozic a rychlostí zcela určen [10]. Jedná se o jednu ze základních metod statistické mechaniky, umožňující popisovat interakce molekul od atomární úrovně, až po systémy s velkým počtem stupňů volnosti [11]. Je velmi výhodná například pro zkoumání struktury a vlastností makromolekul, přičemž programy původně vznikly pro simulování proteinů, ale dneska se už simulují i jiné makromolekuly, jako jsou třeba polysacharidy (a tedy i HA) [12].

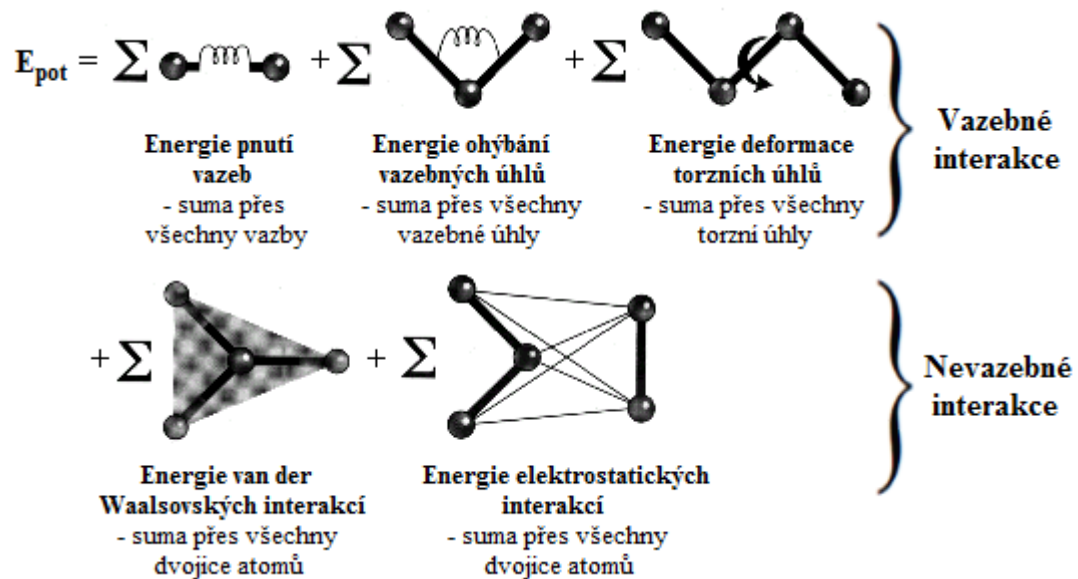
V klasické MD popisujeme molekulu jako soubor bodových nábojů a vazeb mezi nimi, a proto k popisu dynamiky systému využíváme Newtonovskou mechaniku [13].

2.1 Princip a využití

Hlavní součástí simulace je model systému [10]. Ten je v MD definován polohou a hybností jednotlivých částic. Částice se nacházejí v potenciálovém poli, které je tvořeno superpozicí potenciálu každé částice. Pro provedení samotné simulace je potřeba znát jejich souřadnice (polohy) a počáteční rychlosti (vektory rychlostí), které jsou přiřazovány náhodně podle Maxwell-Boltzmannova rozdělení pro danou teplotu [13].

Částice, jako jsou protony, neutrony a elektrony, nejsou v MD uvažovány odděleně, ale jako součásti atomů [14]. Atomy reprezentují sférické částice s určitým nábojem (lokalizovaným v jejich středu) a poloměrem (van der Waalsův poloměr, odpovídající naměřeným hodnotám). V místech, kde mezi sebou atomy tvoří kovalentní vazbu, aplikujeme harmonickou funkci (potenciál), jejíž analytický tvar se volí podle pevnosti vazby. Na chemické vazby se tedy v molekulové mechanice nahlíží jako na pružiny s charakteristickou délkou a tuhostí (popsanou určitou konstantou) [13].

Energie pnutí vazeb (neboli potenciálová funkce) je, jak už bylo řečeno, vytvořena na základě klasické Newtonovy mechaniky. Počítá potenciální energii jako součet energií všech interakcí v rámci molekuly. Ty jsou párové a dělí se na vazebné a nevazebné (přehled na Obr. 3) [14].



Obr. 3 – Přehled složek potenciálové funkce (vazebných a nevazebných interakcí) [15]

Vazebné interakce popisují, jak moc se geometrie molekuly liší od „ideálního stavu“ (v rámci silového pole jsou definovány ideální délky vazeb, vazebné úhly a torzní úhly). Čím více se určitý reálný parametr liší od ideálního, tím větší má daná interakce energii. Nevazebné interakce jsou pak elektrostatické (určují vzájemné interakce nábojů jednotlivých atomů a jejich potenciální energie je popsána Coulombovým zákonem) a van der Waalsovské. Ty byly objeveny na základě studia chemických vlastností zkapalněných vzácných plynů a jsou způsobeny třemi typy sil: coulombickými, indukčními a disperzními [14].

Nejlépe známým modelem těchto interakcí je Lennard-Jonesova 12-6 funkce, tvořená repulzní a atrakční složkou, která má pro výpočet energie van der Waalsovské interakce mezi dvěma atomy tvar, jaký vidíme na Obr. 4 (kdy r je vzdálenost atomů, σ je vzdálenost, v níž na sebe atomy začínají silově působit, a ε nejmenší energie, kterou může daná dvojice atomů mít) [14].

$$E_{LJ} = 4\varepsilon \left[\underbrace{\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12}}_{\text{repulze atomů}} - \underbrace{\left(\frac{\sigma}{r}\right)^6}_{\text{atrakce atomů}} \right]$$

Obr. 4 – Lennard-Jonesův potenciál [15]

Pokud chceme zkoumat vlastnosti makromolekul ve vodném prostředí, nabízí se nám hned několik již předdefinovaných modelů této molekuly. Jedná se například o modely TIP3P, TIP4P, SPC, rozšířené modely SPC/E a F3C. Pravděpodobně nejčastěji používaným modelem je TIP3P [16]. Je pro něj charakteristické to, že vzdálenosti kyslíku a vodíků zůstávají stále stejné a úhel mezi vazbami k vodíkům také (i přesto, že ve skutečnosti se tyto vzdálenosti i úhel neustále mění). Z toho pochopitelně vyplývají určitá omezení, ovšem pokud nechceme neúměrně zvyšovat časovou náročnost simulací (kterou by obrovský počet molekul vody bezpochyby značně zvýšil), musíme je přijmout.

Silová pole, určená pro simulace, jsou stále vyvíjena a zdokonalována. V současné době jsou nejvíce využívány nejnovější verze silových polí AMBER, CHARM a MacroModel [14]. Silová pole obsahují ideální parametry pro interakce atomu (jako jsou délky vazeb, vazebné úhly a torzní úhly) a silové konstanty [14]. Získávají se buď z experimentu (RTG a neutronová difrakce, NMR, rotační spektroskopie, vibrační spektroskopie), nebo výpočtem [15].

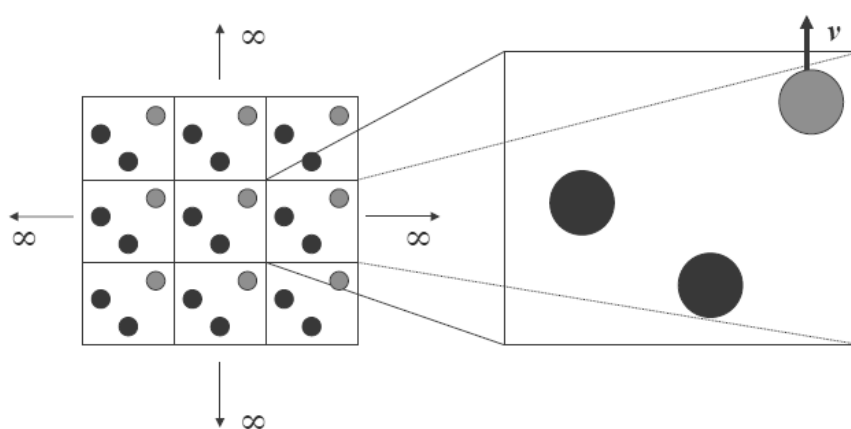
Všechny vlastnosti silového pole a také další parametry se do simulace zadávají pomocí souboru s příponou „.namd“. Ukázku z tohoto souboru je možné vidět na Obr. 5.

```
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####  
# Input  
paraTypeCharmm      on  
parameters          /storage/praha1/home/a3_kolarikova/par_top.inp  
# temperature        $temperature  
  
# Force-Field Parameters  
exclude              scaled1-4  
1-4scaling           1.0  
cutoff               10.0  
switching            on  
switchdist           8.0  
pairlistdist         12.0|  
  
# Integrator Parameters  
timestep             1.0 ;# 1fs/step  
rigidBonds           water  
molly                on  
nonbondedFreq        2  
fullElectFrequency   6  
stepspercycle        30
```

Obr. 5 – Ukázka parametrů, které je potřeba nastavit při zadávání simulace

Dále se v simulacích nastavují teplota, tlak, frekvence restartů, počáteční čas simulace i délka běhu. Časový vývoj je řešen numericky s integračním krokem, který se volí v rozmezí od 1 do 2 fs [13].

Významnou roli v simulacích plní také nastavení periodických okrajových podmínek, jejichž princip je naznačen na Obr. 6. Bez nich by totiž atomy v okrajových oblastech (v reálném prostředí jsou tam pochopitelně další molekuly, ale v případě simulací je prostor omezen) neměly s čím interagovat a simulace by byla nereálná [17].



Obr. 6 – Princip periodických okrajových podmínek [17]

Pokud tedy je definovaný prostor, ve kterém bude simulace probíhat, definované parametry a všem přítomným částicím byly přiřazeny počáteční pozice a rychlosti (buď zcela nové, nebo z předchozího běhu simulace), tak už zbývá jen simulaci nechat zpracovat k tomu určeným programem, většinou paralelně na více počítačích, jelikož úlohy MD jsou postaveny na opakovaném vyčíslování relativně jednoduché rekurentní formule, do které vstupují pouze údaje z nejbližšího okolí právě zpracovávaného atomu [10].

Přestože MD simulace nemohou samy o sobě poskytovat nové znalosti o struktuře, jsou velmi užitečné, jelikož se na jejich základě dají vytvářet hypotézy, které mohou být experimentálně testovány [2]. Hypotézy, které v takovém případě vytvoříme, pak často vykazují až překvapivě dobrou shodu s experimentálními daty. Navíc se simulace dají využít ve vzdělávání. Pohyby na atomární úrovni jsou často obtížně představitelné, a tak může využití MD simulací k demonstraci popisovaných přírodních jevů výborně vypomocet a skvěle obohatit jakoukoli prezentaci [18].

Výpočty jsou ovšem velmi rozsáhlé a značně časově náročné (např. v MetaCentru se na 16 procesorech i pro tak „jednoduchý“ systém, jako je HA s vodou a ionty počítá 1 ns přibližně čtyři dny). V zájmu zjednodušení je tedy občas potřeba zanedbat některé jevy a efekty (například ty polarizační). A to dodává MD další omezení.

Problémem je například ztráta informace o distribuci elektronů, protože energie molekuly je vyjádřena pouze jako funkce vzájemné polohy jader. Hlavním nedostatkem těchto metod je tedy znemožnění studia procesů, kde dochází ke změně elektronové distribuce, jako jsou například chemické reakce [13]. Moc reálné není ani to, že aby bylo možné simulaci spustit, vyžaduje se celková elektroneutralita systému [17]. Pokud si ale ten, kdo měření provádí, tato omezení uvědomuje a počítá s nimi, nebo měří v takové oblasti, aby to výsledky nějak významně neovlivnilo, dá se říci, že jsou simulace MD velmi dobrým nástrojem, díky kterému je možné popisovat a zkoumat dynamiku systémů na molekulární i atomární úrovni [11].

2.2 Software NAMD a VMD

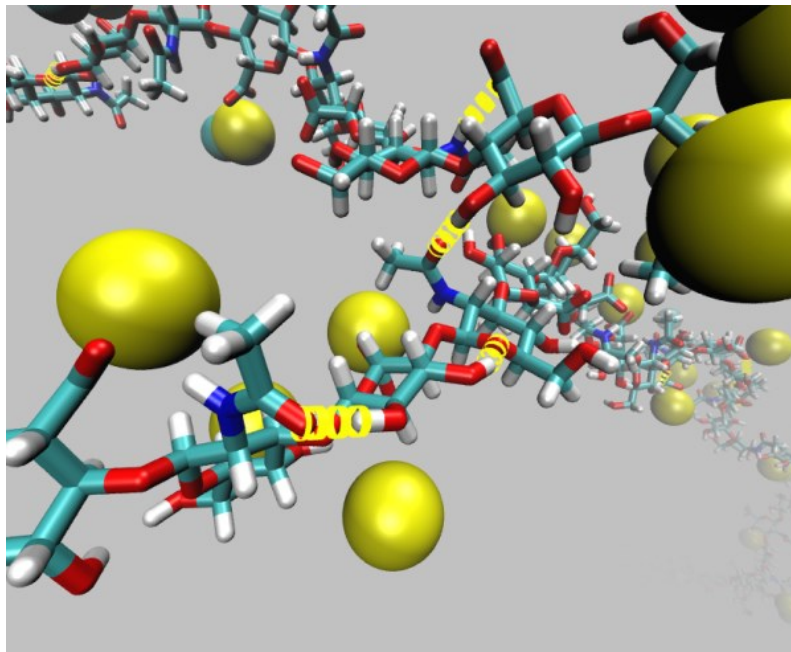
NAMD je paralelní kód molekulární dynamiky, navržený pro vysoce výkonné simulace velkých molekulových systémů. Pro simulace využívá značné množství jader – v řádu stovek pro ty jednodušší a až přes 500 000 jader pro ty největší. Byl vyvinut Teoretickou a výpočetní biofyzikální skupinou z Beckmanova institutu pro pokročilé vědy a technologie na Illinoiské univerzitě v Urbana-Champaign [19].

NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics) je k dispozici jako bezplatný software pro nekomerční užití jednotlivců, akademických institucí i firem. Je distribuován i se zdrojovým kódem [19]. Pro nastavení simulačních parametrů využívá, jak už bylo zmíněno výše, zadávací soubor s příponou „namd“, pro analýzu trajektorií grafický program VMD a pracuje se silovými parametry z CHARMM [19].

Program VMD (Visual Molecular Dynamics) je pak určen pro práci s výstupy simulací MD, jejich vizualizaci a analýzu biochemických systémů, jako jsou proteiny, ale dnes už také polysacharidy (jako je třeba HA), nukleové kyseliny, lipidové dvojvrstvé sestavy a další typy makromolekul [20].

Výstupy ze simulací, které je program VMD schopen číst a také zobrazit v nich obsažené struktury (pomocí široké škály stylů vykreslování a barevných metod, jak je vidět na Obr. 7), bere buď ze standardních souborů s příponou „pdb“, nebo z přímého propojení k běžné

MD simulaci [21]. VMD také obsahuje paralelní program MD NAMD a software MDCOMM, který se používá k připojení vizualizačních a simulačních programů [20].



Obr. 7 – Ukázka výstupu z VMD – řetězce HA v zobrazení „licorice“, vodíkové vazby v zobrazení „Hbonds“ (žluté kroužky) a ionty v zobrazení „VdW“ (žluté koule)

3 PŘEDCHOZÍ SIMULACE HYALURONANU

S HA už bylo v minulých letech za použití MD provedeno několik simulací. Nebylo jich mnoho, ale byla jimi potvrzena přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb (HB), jejich vliv na strukturu HA, velká citlivost hyaluronanu na koncentraci elektrolytu ve svém okolí a také vliv vody samotné na tvar HA řetězce [22].

3.1 Vodíkové vazby

Co se týče vodíkových vazeb, existuje řada experimentálních důkazů, které podporují teorii, že sousední cukry v hyaluronanu spojují neustále vznikající a zanikající sady HB [2]. Tato síť přechodných vazeb molekulu na místní úrovni zpevňuje [7]. Je také potvrzeno, že mají tyto vazby významný podíl na tvaru klubka. Data ze studií na toto téma naznačují, že dynamické intramolekulární vodíkové vazby mezi sousedními sacharidy a účinek vzájemného elektrostatického odpuzování HA přispívají k vysoce expandované makromolekulární konformaci. Vodíkové vazby totiž omezují rotaci a ohnutí glykosidických vazeb, čímž vytváří zpevněný polymerní řetězec [23]. Nicméně při fyziologických koncentracích zůstávají jednotlivé HA řetězce mobilní a v žádném stadiu HA roztoky neprocházejí přechodem do stavu podobného gelu [24]. Celkově se zatím nepodařilo prokázat vliv koncentrace soli na počet těchto vazeb – prozatím se zdá, že celkový počet vodíkových vazeb mezi skupinami řetězce je na koncentraci soli téměř nezávislý [6].

Co se týče intermolekulárních HB typu řetězec-řetězec, nebyly o nich zatím nalezeny žádné důkazy, tedy minimálně ne v roztoku za fyziologických podmínek (a za jiných se ještě moc výzkumů nedělalo) [24]. Jejich přítomnost byla sice experimentálně zkoumána, ale výsledkem bylo jen to, že případná přítomnost intermolekulárních vazeb typu řetězec-řetězec nijak významně neovlivňuje vlastnosti koncentrovaného roztoku HA [25]. Výzkum na toto téma, který by využíval MD, se mi dohledat nepodařilo.

3.2 Vliv iontů na strukturu

Jelikož hyaluronan je polyanion, jeho konformace v roztoku je citlivá na různá iontová prostředí. Např. difúzní koeficient HA je v nepřítomnosti jakéhokoliv podpůrného elektrolytu velmi nízký, ale jen s malým zvýšením koncentrace NaCl dramaticky roste [23]. Proto byla většina měření prováděna v roztocích různých solí a nejčastěji právě NaCl o různých koncentracích [25].

Vlastnosti hyaluronanových roztoků ve vyšších koncentracích NaCl (0,2M a 0,5M), byly studovány už v roce 1995 [26]. Ve stejném roce byly provedeny i simulace interakcí hyaluronanu s jinými sloučeninami, jako jsou zejména kvartérní amoniové soli [27]. Dále byla provedena komplexní studie vlastností HA v koncentraci 0,15M NaCl [28] a studie roztoků hyaluronanu při různých koncentracích NaCl a CaCl₂ [29]. Tyto výzkumy ukázaly, že s rostoucí iontovou silou se snižuje gyrační poloměr, a v roztoku CaCl₂ vznikají oproti roztoku NaCl celkově menší klubka. Pro vyšší koncentrace soli je k dispozici méně údajů. O experimentech, prováděných v 1M NaCl, bylo možno dohledat pouze jednu publikaci, a to z roku 2017. Zde bylo potvrzeno, že hlavní silou, která řídí konformační změny makromolekuly, je interakce kationtů a také molekul vody s polymerním řetězcem [6].

3.3 Vliv vody na strukturu

Většina simulací byla prováděna ve vodném prostředí a, jak už bylo uvedeno výše, interakce molekul vody s polymerním řetězcem má velký vliv na konformaci makromolekuly. Zatímco interakce řetězce s ionty s koncentrací elektrolytu roste, interakce s vodou klesá [6]. Bylo také zjištěno, že větší množství vody v blízkém okolí glykosidických vazeb zvyšuje propojení monosacharidů pomocí HB [30].

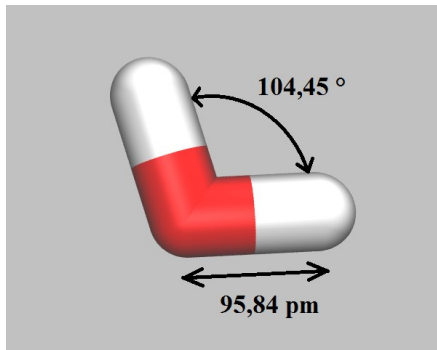
Že tedy voda silně reaguje s molekulou HA a tvoří s ní vazby je známo. Co se ovšem týče vlivu molekul vody na počet intermolekulárních vazeb mezi více řetězci HA, myslím, že takové studie ještě provedeny nebyly.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 ZKOUMANÝ SYSTÉM A POUŽITÉ METODY

V rámci této práce byly simulovány vzájemné interakce dvou řetězců hyaluronanu ve vodném prostředí o různé koncentraci NaCl. Každý řetězec se skládal z 24 monomerů (každý z nich pak ještě ze dvou monosacharidů). Vycházelo se z předpokladu, že chování vybrané části řetězce je stejné bez ohledu na to, zda existuje jako volný oligosacharid, nebo jako část dlouhé makromolekuly [4]. Dohromady tedy v jedné simulaci bylo 48 monomerů hyaluronanu na 103 977 molekul vody (plus různé koncentrace iontů). Dvojice řetězců vůči sobě byla natočena antiparalelně, protože při jiném natočení nevznikaly intermolekulární HB, jejichž popis byl cílem práce.

Zatímco vzájemné silové působení atomů v molekule HA nebylo nijak zjednodušováno a výpočty byly prováděny se zahrnutím všech vazebných i nevazebných interakcí, co se týče molekul vody, pracovalo se (vzhledem k jejich obrovskému množství) s modelem TIP3T (viz Obr. 8), který zanedbává jak kmitání mezi kyslíkem a vodíky, tak kmitání jimi tvořeného úhlu.



Obr. 8 – Model vody TIP3T

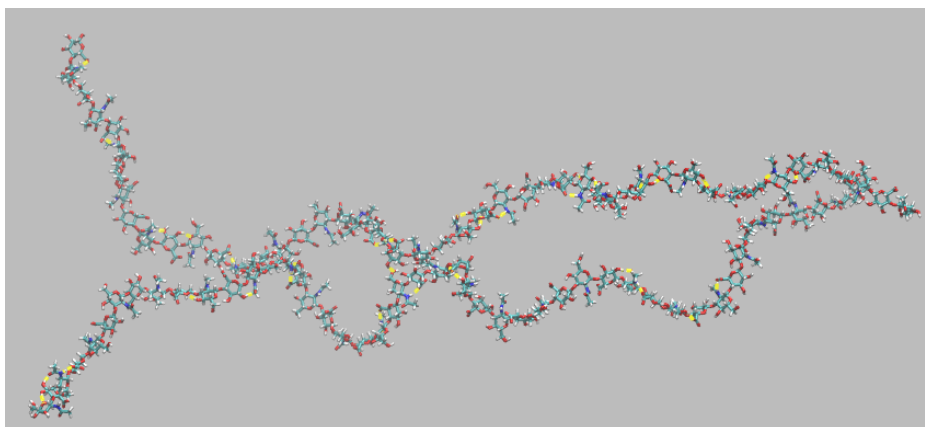
Simulace byly prováděny pro čtyři různé koncentrace NaCl, přičemž aby byl výsledný náboj všech simulovaných systémů nulový, bylo ke každému řetězci přidáno ještě 24 iontů sodíku. Tento krok byl nezbytný, jelikož simulace by se s nenulovým celkovým nábojem nedala spustit (jak už bylo uvedeno výše v kapitole 2). Koncentrace, simulované v této práci, byly: 1M, 0,6M, 0,2M a 0M (polyelektrolyt pouze neutralizován Na⁺).

Simulovaná teplota byla 275 K, záměrně zvolena nízká, aby se co nejvíce omezily účinky tepelného pohybu. Časový krok byl 1 fs, v simulacích nejmenší možný, protože nejrychleji kmitající atomy (vodíky) se účastní právě zde zkoumaných vodíkových vazeb.

Výpočty byly realizovány s využitím Metacentra, data zadávána pomocí příkazového rozhraní PuTTY. Výstupní soubory pak byly zpracovávány na výpočetním počítači UFMI FT UTB v programu VMD. Program následně zjistil počet HB podle jejich geometrické definice, kdy vzdálenost donoru a akceptoru byla menší nebo rovna 3 Å a úhel, který svíraly roviny donor-vodík a vodík-akceptor, byl menší než 20°.

Dále byly prováděny také výpočty nevazebných energií mezi řetězci navzájem, mezi řetězci a sodnými ionty v okolí a také mezi řetězci a molekulami vody. To vše přes software NAMD (viz kapitola 2).

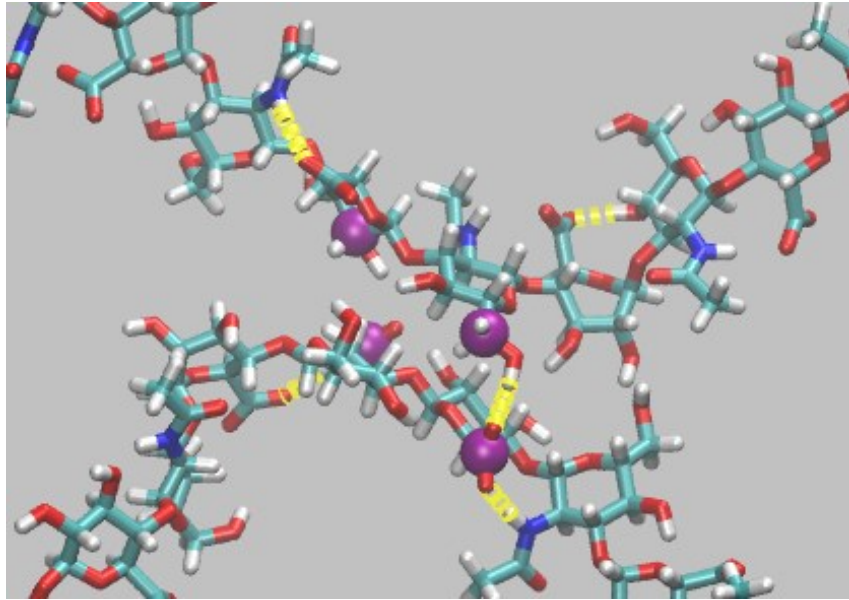
Počáteční konfigurace všech simulovaných molekul byla pro všechny koncentrace stejná a to relativně natažené řetězce, spojené uprostřed vodíkovou vazbou (viz Obr. 9). Tato vstupní pozice byla výstupem předchozí práce, kdy mezi dvěma antiparalelními řetízky spontánně vzniklo místo s několika poměrně stabilními intermolekulárními HB (na poměry ostatních dynamicky vznikajících a zanikajících intermolekulárních vazeb).



Obr. 9 – Počáteční konfigurace řetězců u všech simulovaných systémů

Původně byly výpočty prováděny na právě takto definovaných „volných“ molekulách. Vzhledem k tomu, že zvláště při nízkých koncentracích soli měly řetězce tendenci se od sebe vzdalovat, byl pak pro každou koncentraci NaCl simulován ještě systém, ve kterém

byly polohy čtyř atomů uhlíku v místech, kde docházelo nejčastěji ke vzniku HB, fixované (viz Obr. 10).



Obr. 10 – Detail monosacharidů uprostřed obou řetězců se zvýrazněnými fixovanými atomy uhlíku (fialově)

Řetězce HA v těchto systémech se tedy vzdálit nemohly a bylo proto zajímavé pozorovat jejich následující chování – jestli budou mít tendenci dostávat se od sebe co nejdál, nebo naopak budou mít snahu interagovat.

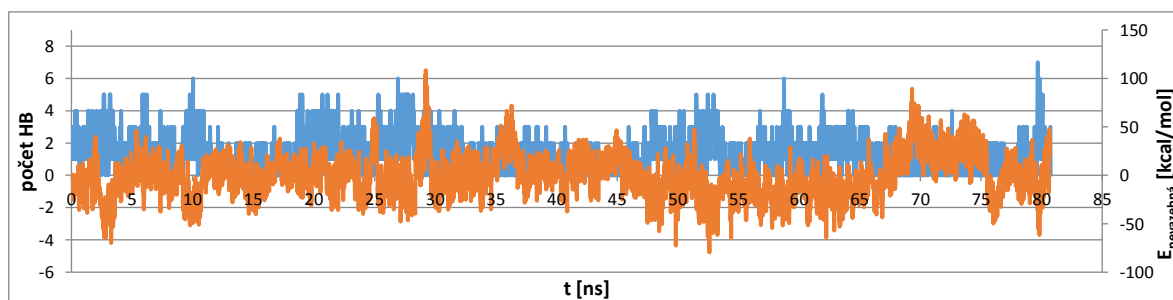
5 FIXOVANÉ ŘETĚZCE

Jelikož i v reálném prostředí mohou být řetězce v situaci, která jim nedovoluje se od sebe vzdálit (např. protože jsou obklopeny dalšími řetězci), jsou tyto simulace s fixovanými řetězci, a hlavně jejich výsledky, pravděpodobně průkaznější než jejich nefixované protějšky, a proto jsou zde uvedeny jako první i přes to, že byly dělány až později.

Fixovány byly, jak už bylo uvedeno výše, čtyři konkrétní uhlíky vždy ve dvou sousedních monosacharidech. Toto opatření bohužel do měření vneslo ten problém, že najednou byly minimálně dva HB (mezi fixovanými uhlíky) zcela jisté. Při měření vzájemných interakcí se proto tyto části řetězců musely odečítat, jelikož jejich vzájemná interakce byla nevyhnutelná.

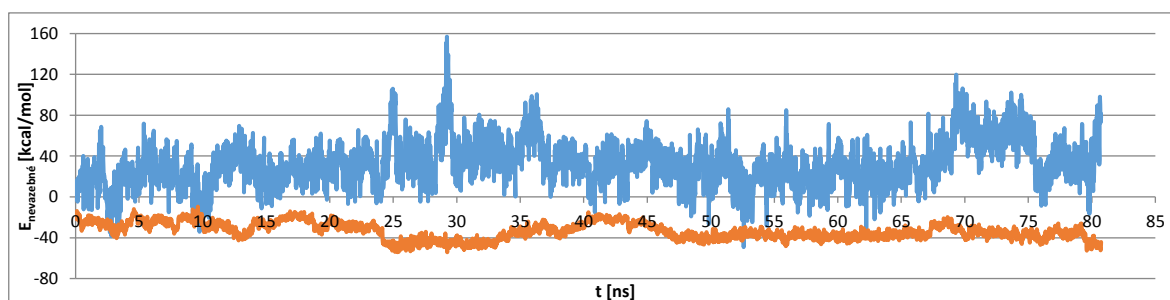
5.1 Interakce mezi řetězci

Předmětem práce bylo zkoumání nevazebných interakcí mezi hyaluronany. Do této kategorie lze zařadit už mnohokrát zmiňované HB a pak také další nevazebné interakce (elektrostatické a van der Waalsovy, nebo například hydrofobní interakce). Počítány byly pochopitelně všechny typy interakcí, ale pro hlavní orientaci sloužily právě HB, protože po prozkoumání časového průběhu HB, elektrostatických a van der Waalsových (VdW) interakcí pro různé systémy byly jako nejvíce vypovídající charakteristika pro popis míry interakce mezi řetězci vybrány HB. Z Obr. 11 je patrné, že obě veličiny (jak energie nevazebné interakce, tak počet HB) poskytují o interakci řetězců podobnou informaci (v časech s více HB je výsledná nevazebná interakce přitažlivá), ale průběh nevazebných interakcí více kolísá.



Obr. 11 – Počet intermolekulárních HB (modrá) a celková energie nevazebných interakcí mezi řetězci (oranžová) v závislosti na čase, pro 1M koncentraci soli a fixované řetězce

Celková ne vazebná interakce na Obr. 11 je kombinací elektrostatické a VdW interakce. Jejich typický průběh je vidět na Obr. 12, z něhož je patrné, že výsledný tvar určuje elektrostatická interakce a VdW jen mírně koriguje její průběh. Profil obou křivek je ale velmi podobný.

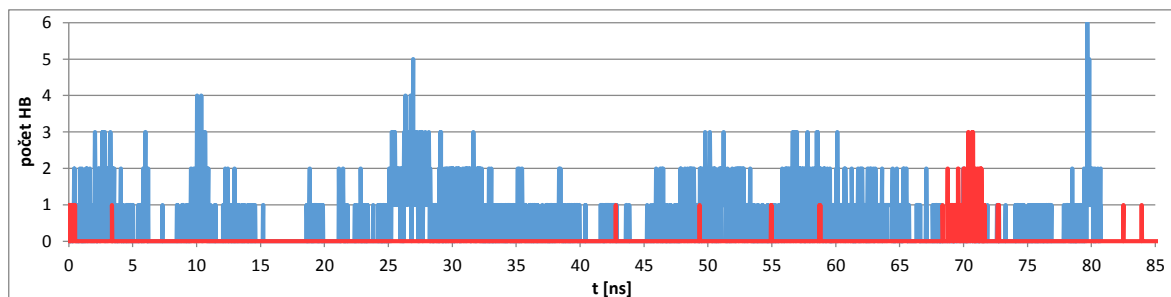


Obr. 12 – Energie elektrostatické interakce (modrá) a VdW interakce (oranžová) mezi fixovanými řetězci v závislosti na čase, pro 1M koncentraci soli

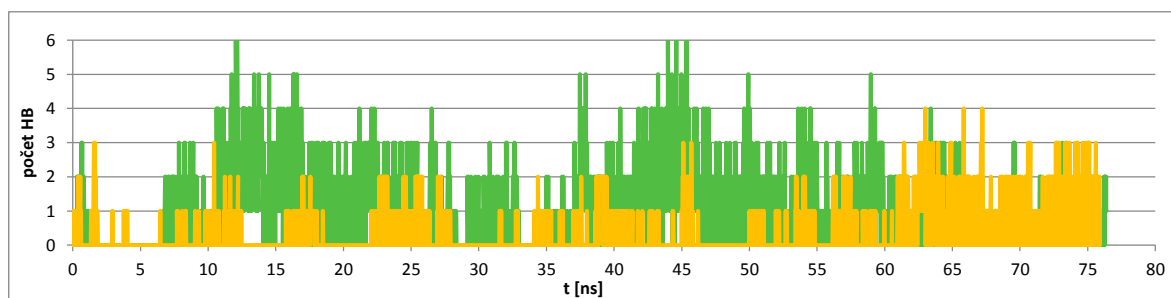
Celkový počet HB mezi hyaluronany i přes nízkou teplotu nebyl velký. Intermolekulární vazby vždy vznikly na určitém místě, nějakou dobu se tam objevovaly a poté se řetězce zase vzdálily a ke vzniku HB došlo jinde. Častěji je bylo možné pozorovat u vyšších koncentrací soli, naopak u neutrálního prostředí téměř nevznikaly.

Pokud tedy dojde ke srovnání počtu intermolekulárních vazeb u 1M koncentrace a u systému, do kterého byly přidány pouze sodné ionty za účelem neutralizace (0M koncentrace), jak je vidět na Obr. 13, je zde značný rozdíl.

Není ovšem možné jednoznačně říci, že čím vyšší koncentrace, tím více intermolekulárních vazeb, protože ze srovnání počtu HB při 0,6M a 0,2M koncentraci soli (Obr. 14) je vidět, že minimálně u 0,6M je jich víc než u 1M koncentrace. K tomuto fenoménu se ještě vrátí 6. kapitola. I na tomto obrázku je však vidět značný rozdíl v počtu HB oproti 0M koncentraci.

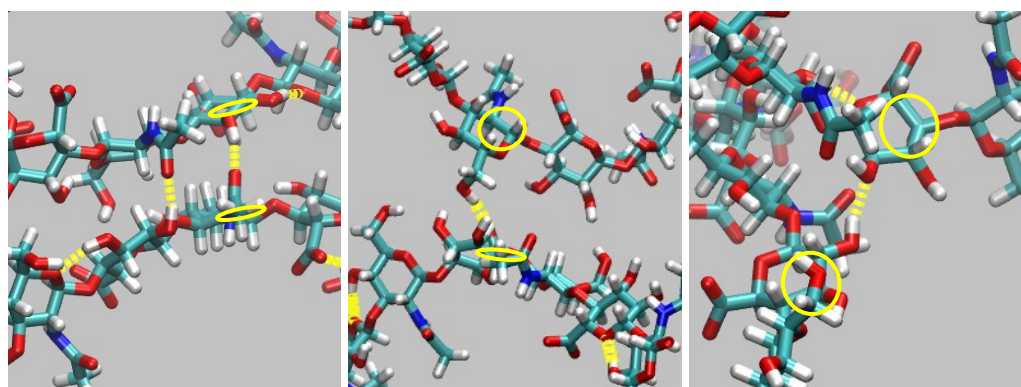


Obr. 13 – Počet intermolekulárních HB v závislosti na čase pro 1M (modře) a 0M (červeně) koncentraci soli a fixované řetězce



Obr. 14 – Počet intermolekulárních HB v závislosti na čase pro 0,6M (zeleně) a 0,2M (oranžově) koncentraci soli a fixované řetězce

Vzájemné polohy disacharidových jednotek v místech, kde se tvořily HB, bylo možné rozdělit na několik typů – typ B, typ R a typ T (viz Obr. 15).



Obr. 15 – Vzájemná poloha cyklů monosacharidových jednotek typu B (vlevo), typu T (uprostřed) a typu R (vpravo)

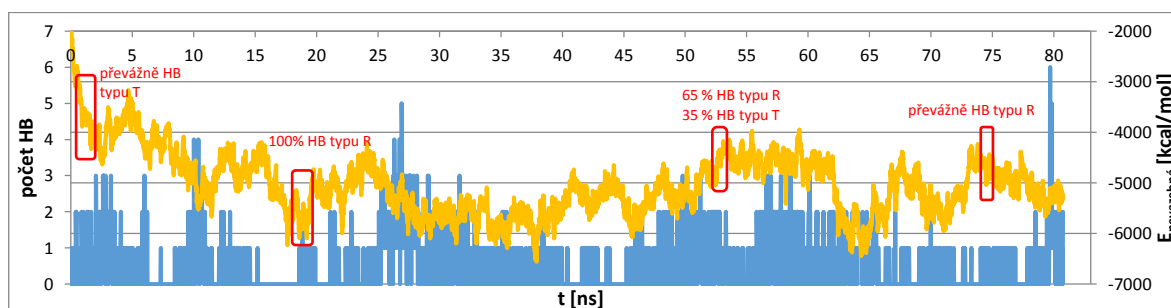
V případě typu B byly roviny cyklů monosacharidů, mezi nimiž byla HB, natočeny vůči sobě téměř rovnoběžně (poeticky by se to dalo nazvat tak, že cykly byly „bříšky“ k sobě) a naopak u typu R ležely oba cykly cukrů podílejících se na vazbě v jedné rovině (jako by se držely za „ruce“).

Častější byly ve všech případech R typy, ale u všech koncentrací bylo možné nalézt i další, třeba typ T – přechodný stav mezi typy B a R, kde byly roviny cyklů vůči sobě kolmé (tedy ve tvaru písmene T).

5.2 Vliv iontů na interakci řetězců

Vliv iontů by se dal rozdělit na globální a lokální, podle toho, jestli se konkrétní ionty účastní vzniku konkrétních HB, nebo je jejich vliv na řetězce zprostředkovaný jen přes jejich působení na vodu. O globálním vlivu není pochyb. V nasolených systémech se mezi řetězci tvoří více HB. Nabízela se také otázka, jestli míra interakce řetězců s ionty má vliv na typ vzájemné polohy cyklů podílejících se na HB.

Při zaměření se na typy vazeb (tedy B, R a T) a srovnání přítomnosti těchto typů s velikostí ne vazebné interakce mezi ionty Na^+ a řetězci se zdá, že čím vyšší hodnotu (v absolutních číslech) má tato ne vazebná interakce, tím častěji se tvoří HB typu R a naopak, čím je hodnota ne vazebné interakce mezi ionty Na^+ a řetězci menší, tím častěji dochází ke vzniku typu B, nebo něčeho, co se mu blíží (viz Obr. 16). Z Obr. 16 je však také vidět, že celkový počet vazeb a energie ne vazebné interakce řetězců s ionty spolu s velkou pravděpodobností nijak nesouvisí.

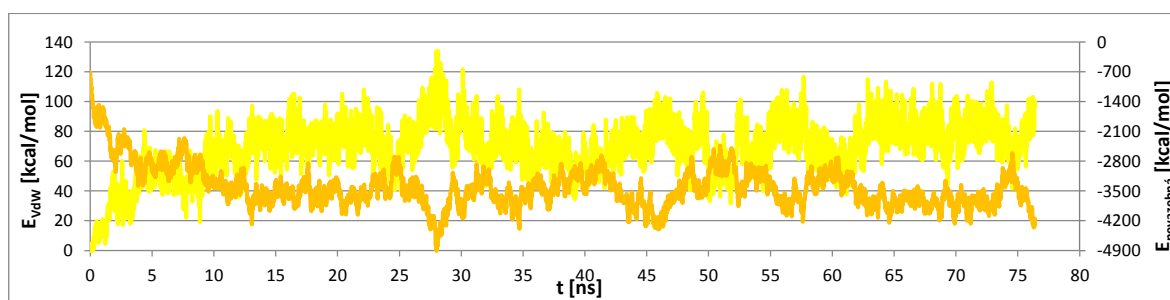


Obr. 16 – Graf počtu HB (modrá) a energie ne vazebné interakce řetězců s ionty (oranžová) v závislosti na čase pro 1M koncentraci a fixované řetězce

Dá se tedy říct, že na globální úrovni je jistá korelace mezi typem vzájemné polohy cyklů spojených HB a velikosti nevazebné energie mezi řetězci a ionty prokazatelná, jelikož se tento fenomén objevil u všech typů všech simulovaných koncentrací.

Naproti tomu existence lokálního vlivu prokazatelná není. Nepodařilo se pozorovat žádný případ, kdy by výskyt některého konkrétního iontu způsobil vznik, nebo zánik vazby.

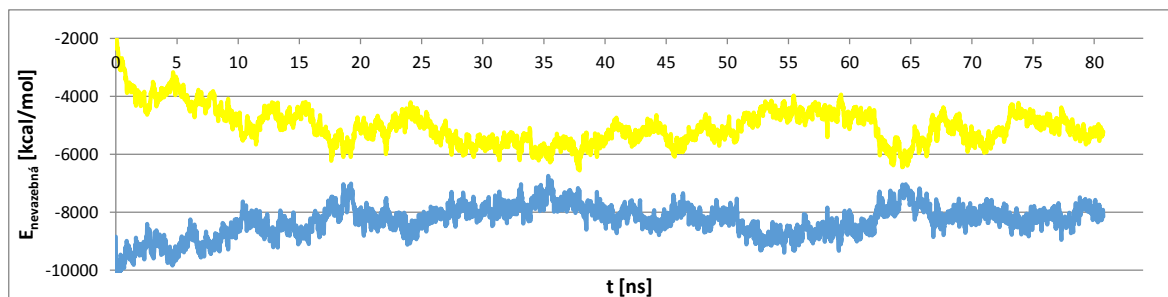
Zajímavé také je, že časové závislosti celkové nevazebné energie a VdW energie mezi ionty Na^+ a hyaluronany mají téměř přesně opačný průběh (jak je vidět na Obr. 17) a to při všech koncentracích. V absolutních hodnotách se ovšem opět značně liší. Tato informace by nepřekvapila u srovnání elektrostatické a VdW interakce, jelikož tam už bylo výše uvedeno, že jsou si profily velmi podobné, zde ovšem došlo kde stejné shodě i mezi VdW a celkovou nevazebnou energií.



Obr. 17 – Závislost VdW energie (žlutá) a celkové nevazebné energie (oranžová) mezi ionty a fixovanými řetězci hyaluronanu (při koncentraci soli 0,6M) na čase u fixovaných řetězců

5.3 Vliv vody na interakci řetězců

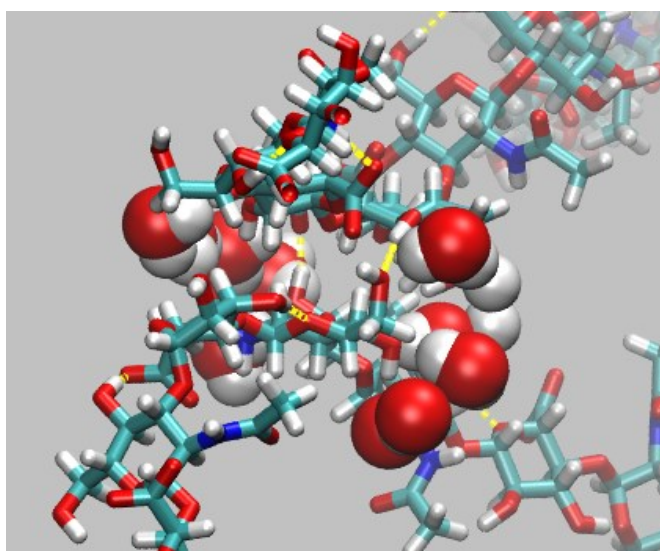
Jak už bylo řečeno výše, globální vliv iontů by mohl být způsoben tím, že se na ionty naváže voda a nemá už tolik prostoru k reakci s molekulami HA. Celková nevazebná interakce hyaluronanů s vodou má totiž přesně obrácený průběh oproti celkové nevazebné interakci hyaluronanů se sodnými ionty (jak je vidět na Obr. 18).



Obr. 18 – Časové závislosti nevazebných energií vody (modře) a sodných iontů (žlutě) vůči hyaluronanům pro 1M koncentraci NaCl a fixované řetězce

V tomto případě se jedná o 1M koncentraci, jelikož sice i u všech ostatních koncentrací byly tyto dvě závislosti komplementární, ale vzhledem k tomu, že zde bylo méně iontů, byla i energie jejich interakcí s ionty menší a naopak energie interakcí s vodou byla v důsledku toho větší, což dělalo grafy méně přehlednými.

Voda tedy s řetězcem interaguje méně, když je přitažlivá interakce sodných iontů s řetězcem vysoká. Za těchto podmínek vznikají HB typu R, kde jsou cykly interagujících monosacharidů vodou ze všech stran obklopeny. Při vzájemné poloze cyklů interagujících monosacharidů typu B naopak platí, že čím více jsou roviny cyklů rovnoběžné, tím více hydrofobní jejich interakce je a voda se mezi řetězcem vyskytuje méně (přestože celkově s řetězcem reaguje více), a když jsou HB dokonalým typem B, tak se mezi řetězcem nevyskytují vůbec žádné molekuly vody (jak je vidět na Obr. 19).

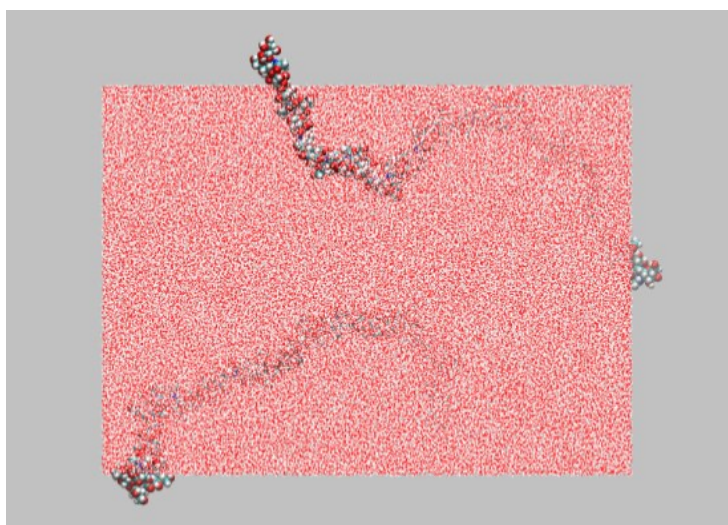


Obr. 19 – HB typu B s vodou v okolí, ale nikoliv mezi řetězcem

6 NEFIXOVANÉ ŘETĚZCE

To, že řetězce nebyly fixované, přinášelo zase jiné typy problémů. Ty největší byly způsobeny počáteční konfigurací. Tím, že na začátku byly řetězce ve velmi příznivé vzájemné poloze pro vznik HB, mohly ty původní intermolekulární vazby držet řetězce u sebe neúměrně dlouho, bez ohledu na koncentraci iontů v okolí. A naopak, pokud se nějakou dobu HB netvořily, řetězce se mohly vzájemně vzdálit natolik, že už vznik dalších vazeb nebyl možný, přičemž při námi simulovaných 80 ns běhu není možné říci, zda se jednalo o náhodu, nebo při dané koncentraci řetězce zkrátka neinteragují.

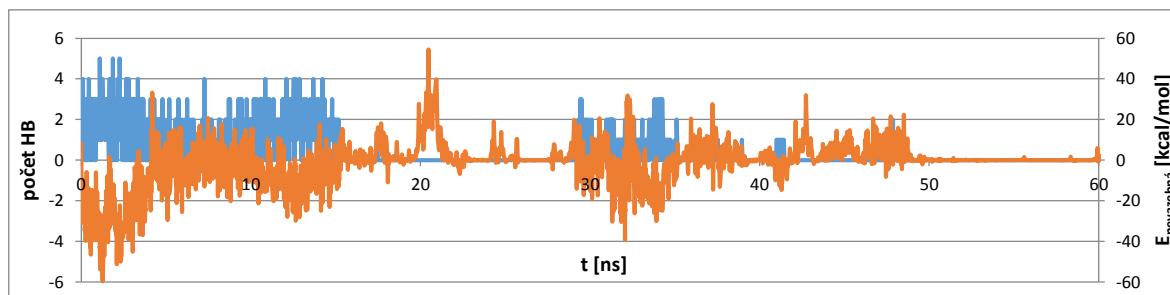
Dalším, spíše technickým, problémem pro zpracování bylo to, že v mnoha případech se řetězce vzdálily natolik, že část některého řetězce úplně opustila definovaný box s molekulami vody (viz Obr. 20) a bylo nutné provádět dodatečné přepočty dle periodických okrajových podmínek.



Obr. 20 – Části nefixovaných řetězců mimo definovaný box molekul vody (pro přehlednost jsou atomy v řetězcích zobrazeny pomocí van der Waalsových sfér)

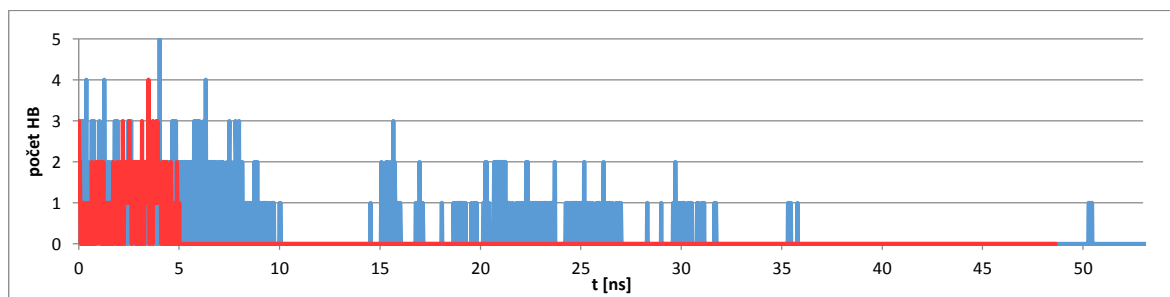
6.1 Srovnání s fixovanými řetězci

U nefixovaných řetězců byly také počítány všechny zmiňované typy interakcí, ale vzhledem k tomu, že jejich profil byl velmi podobný fixovaným, využily se převážně HB. Na Obr. 21 je opět vidět, že významnější přitažlivé interakce mezi řetězci je právě v místech s větším počtem HB.

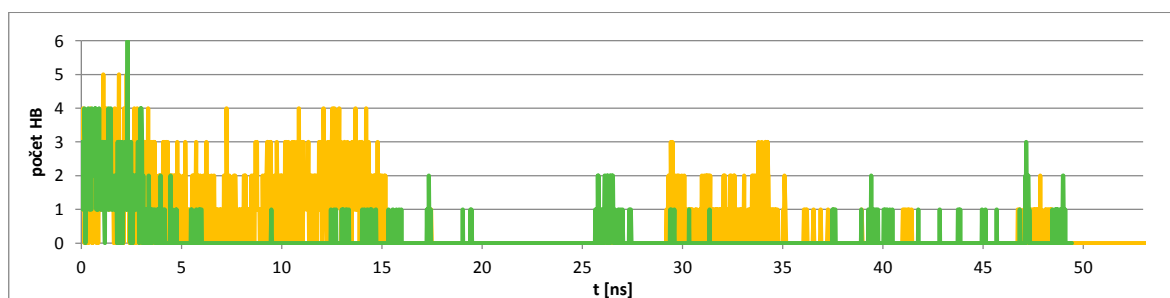


Obr. 21 – Časový vývoj počtu intermolekulárních HB (modrá) a velikosti energie neva- zebných interakcí mezi řetězci (oranžová) pro 0,2M koncentraci a nefixované řetězce

Celkové počty HB byly u každé koncentrace o něco menší než u jejich fixovaných protějš- ků, což bylo způsobeno právě tím, že tyto řetězce měly možnost vzdálit se. Opět ovšem platilo, že když byly v okolí řetězců ionty, vznikaly mezi řetězci vazby a naopak – když se opět srovná 1M a 0M koncentrace (Obr. 22), je vidět značný rozdíl. Není ovšem možné říci, že se jedná o přímou úměrnost mezi počtem HB a koncentrací prostředí, obzvláště po pohledu na srovnání počtů HB při 0,6M a 0,2M koncentraci (Obr. 23).



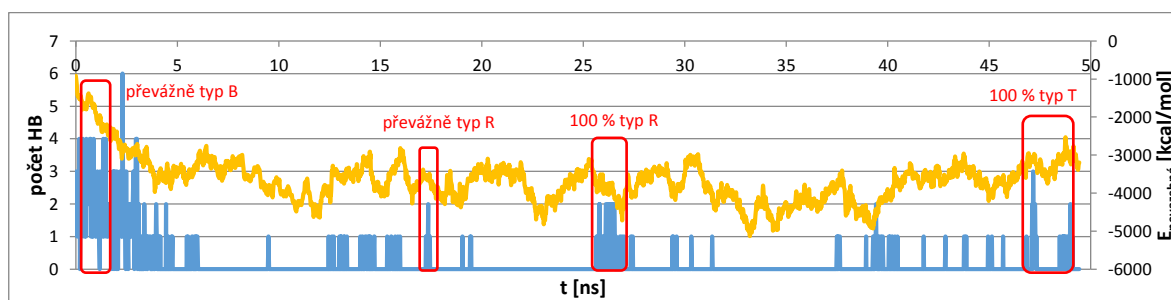
Obr. 22 – Časový vývoj počtu intermolekulárních HB pro 1M (modrá) a 0M (červená) koncentraci a nefixované řetězce



Obr. 23 – Časový vývoj počtu intermolekulárních HB pro 0,6M (zelená) a 0,2M (žlutá) koncentraci a nefixované řetězce

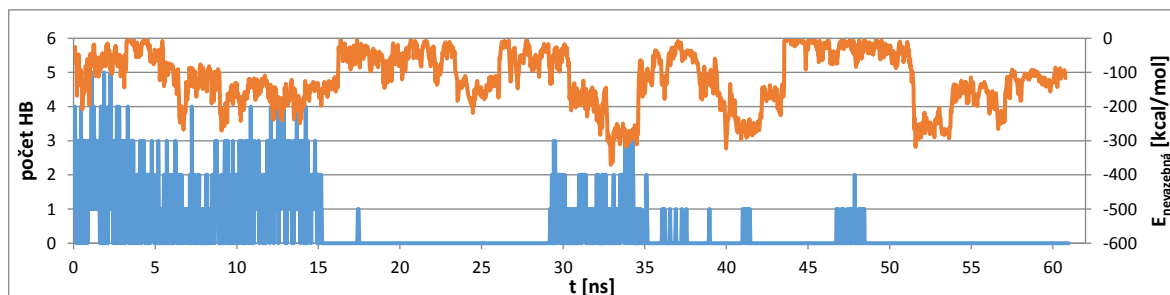
Na časovém vývoji počtu HB v 0,2M koncentraci (na Obr. 23) je také zcela jasně vidět, že zde se vazby skutečně tvoří opakovaně, protože i přes to, že se řetězce na nějakou dobu od sebe vzdálily, i poté znovu došlo k přiblížení a vzniku nových HB. Tento trend je (byť v menší míře) patrný i u ostatních koncentrací (se zřetelnou výjimkou 0M).

Co se týče typů vazeb u nefixovaných řetězců, na rozdíl od těch fixovaných, kde velikost nevazebné interakce řetězců s ionty nikdy neklesla tak nízko, je zde možné pozorovat i typ B (k vidění na Obr. 15 v předchozí kapitole). Taková vazba vznikala vždy na začátku simulace a později už se neobjevovala (jak je vidět na Obr. 24). To ovšem jen potvrzuje teorii, že mezi hyaluronany vznikají převážně R typy, nebo T typy, jelikož počáteční vývoj je si u nefixovaných řetězců (kvůli počáteční konfiguraci) při každé koncentraci velmi podobný a pro účely srovnání je nutné vzít výsledky každé nefixované simulace až od páté nanosekundy.

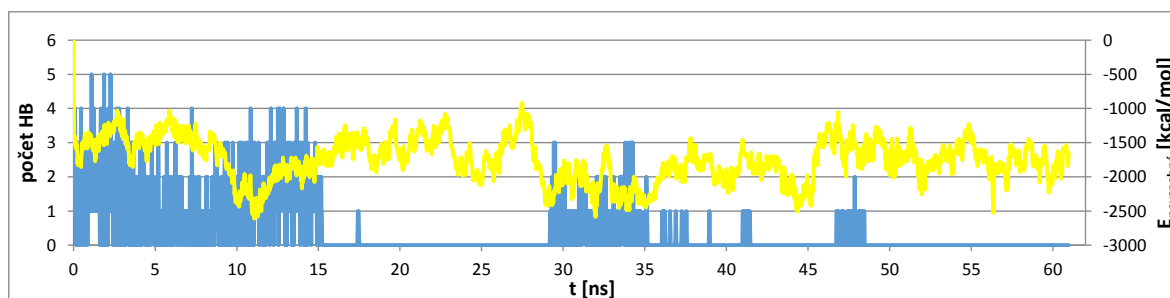


Obr. 24 – Graf vývoje počtu intermolekulárních HB (modrá) a energie nevazebné interakce řetězců s ionty (oranžová) v čase pro 0,6M koncentraci a nefixované řetězce

Globální vliv iontů je tedy i u nefixovaných řetězců zcela jasně patrný. Co se týče lokálního vlivu, ten byl v tomto případě testován tak, že se hledala korelace mezi HB a nevazebnou interakcí jen těch částí řetězců, v jejichž okolí docházelo k tvorbě HB, se sodnými ionty. Výsledky pro 0,2M koncentraci je možné vidět na Obr. 25, kde žádná korelace mezi oběma veličinami patrná není.



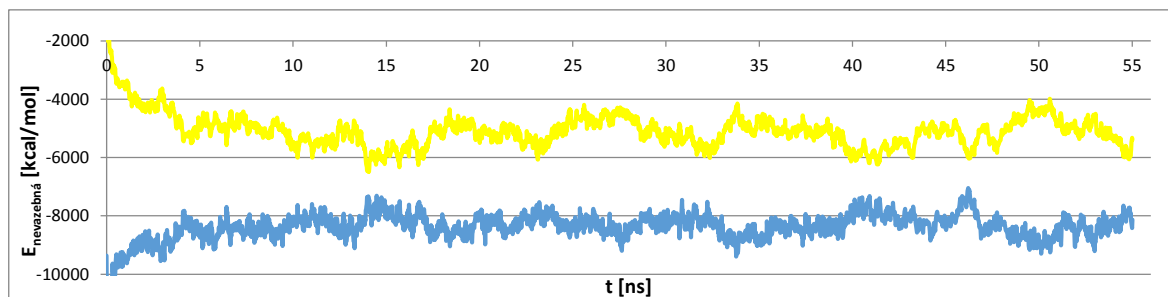
Obr. 25 – Časový vývoj počtu HB (modrá) a velikosti energie ne vazebných interakcí nefixovaných řetězců s ionty z lokálního (oranžová) pohledu pro 0,2M koncentraci



Obr. 26 – Časový vývoj počtu HB (modrá) a velikosti energie ne vazebných interakcí nefixovaných řetězců s ionty z globálního (žlutá) pohledu pro 0,2M koncentraci

Srovná-li se pak lokální interakce iontů s tou globální (pro srovnání na Obr. 26), ani zde není viditelný žádný trend. U ostatních koncentrací to vypadalo podobně – žádná jednoznačná souvislost mezi počtem HB a interakcí iontů s řetězcí v blízkosti HB pozorována nebyla.

Co se týká vlivu vody, ten byl u nefixovaných řetězců naprosto stejný jako u těch fixovaných. Byly dokonce naměřeny i téměř totožné hodnoty (srovnání je možné vidět v tabulkách v závěru této kapitoly). Časový vývoj ne vazebných interakcí řetězců s vodou byl opět zcela komplementární k časovému vývoji ne vazebných interakcí řetězců se sodnými ionty, jak je vidět na Obr. 27 (znovu uváděném pro 1M koncentraci, protože u ostatních byly křivky od sebe dál a graf nebyl tak přehledný).



Obr. 27 – Časové závislosti nevazebných interakcí vody (modrá) a sodných iontů (žlutá) s hyaluronany pro 1M koncentraci NaCl a nefixované řetězce

6.2 Srovnání jednotlivých koncentrací soli

Při porovnání průměrných hodnot počtu HB pro jednotlivé koncentrace soli (fixované i nefixované řetězce), jak je vidět v Tab. 1, se na první pohled se zdá, že jdou od nejmenší při 0M po největší při 1M koncentraci. Z tohoto trendu se ovšem vymykají dvě hodnoty (v tabulce vyznačeny červeně) a to 0,6M koncentrace u nefixovaných řetězců a 0,2M koncentrace u fixovaných řetězců. Dále je jasně patrné, že mezi fixovanými řetězci se tvořilo podstatně více vazeb.

Tab. 1 – Srovnání průměrných počtů intermolekulárních HB pro oba typy uspořádání řetězců a všechny koncentrace soli

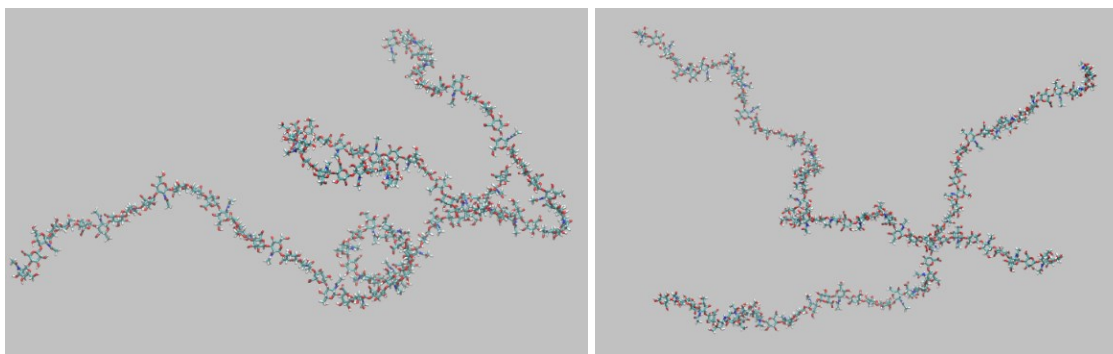
$c(\text{NaCl})$ [mol/dm ³]	Průměrný počet HB	
	fixované	nefixované
1	0.533 ± 0.011	0.264 ± 0.011
0.6	1.010 ± 0.017	0.142 ± 0.007
0.2	0.318 ± 0.010	0.513 ± 0.017
0	0.027 ± 0.003	0.098 ± 0.006

Anomálie u nefixovaných řetězců nemusí být významná, protože v tomto případě může velký vliv hrát náhoda. Pokud by ovšem nebyla způsobena náhodou, je důvod anomálie pro 0,6M koncentraci soli u fixovaných řetězců pravděpodobně ten, že kvůli fixování není možné, aby řetězce zaujaly svůj přirozený tvar šroubovice. I při vizualizaci daných systémů v programu VMD je jasně patrné, že konformace nefixovaných řetězců připomíná šroubovici mnohem více než konformace řetězců fixovaných. Větší linearita fixovaných

řetězců je pro vznik HB výhodnější, více sbalené nefixované řetězce naopak mají mnohem méně příležitostí ke kontaktu.

A s tím nejspíš souvisí i to, proč se hodnoty pro 0,6M koncentraci vymykají z trendu. Na to, jak moc je molekula napřímená, má pravděpodobně vliv počet stabilizujících intramolekulárních HB mezi jednotlivými monosacharidy. Pokud je ovšem molekula hyaluronanu v prostředí, kde se vyskytují ionty, mohou se v důsledku lokálního navázání iontů některé z těchto vazeb přerušit a molekula se deformuje.

Zdá se, že k tomuto narušení intramolekulárních HB (a tedy deformaci řetězců) za teploty 275 K, nejčastěji dochází právě při 0,6M koncentraci soli (jak je vidět na Obr. 28). Je možné, že při 0,2M koncentraci je v těsné blízkosti hyaluronanů sodných iontů ještě příliš málo na to, aby měly potřebný vliv, a při 1M koncentraci už je jich tolik, že si vzájemně konkurují. Díky tomu, že při 0,6M koncentraci jsou řetězce více deformované (a tedy případným vazbám méně přístupné), netvoří nefixované řetězce v 0,6M prostředí tolik vazeb jako v 0,2M. A naopak, pokud fixování zabrání řetězcům v deformaci, jsou na vázání nejnáchylnější právě řetězce v 0,6M koncentraci, byť důvody stále ještě nejsou uspokojivě vysvětleny.



Obr. 28 – Srovnání nefixovaných řetězců v koncentraci 0,6M (vlevo) a 0,2M (vpravo)

Co se týče 1M koncentrace, hypotéza, jak už bylo řečeno, předpokládá, že si ionty navzájem konkurují a to jak ve snaze o deformaci molekuly, tak ve snaze podpořit tvorbu intermolekulárních vazeb. Stále ovšem platí to, že je zde iontů hodně, a proto je jak u fixovaných, tak u nefixovaných řetězců v 1M koncentraci druhý nejvyšší počet HB.

U 0M pak nejsou téměř žádné ionty, které by na sebe navázaly vodu a tím pomohly tvorbě HB, a proto mají řetězce v 0M prostředí nejnižší počet intermolekulárních HB jak ve fixovaném, tak v nefixovaném případě.

Srovnají-li se interakce HA s ionty při různých koncentracích (Tab. 2), výsledky nepřekvapí – tam, kde je iontů více, tam řetězce reagují více a naopak. Co se týče rozdílu mezi fixovanými a nefixovanými řetězci, ten zde je proto, že fixováním se iontům znemožnil přístup k částem řetězce. Je zajímavé, že u 0,6M koncentrace se trend mění – při nižších koncentracích soli s ionty víc interagují fixované řetězce, při vyšších koncentracích soli naopak s ionty víc interagují nefixované řetězce.

Tab. 2 – Srovnání průměrné hodnoty energie interakcí řetězců s ionty Na⁺ pro oba typy uspořádání řetězců a všechny koncentrace soli

c(NaCl) [mol/dm ³]	E _{nevazebná} [kcal/mol]	
	fixované	nefixované
1	-5029 ± 10	-5148 ± 9
0.6	-3412 ± 8	-3751 ± 9
0.2	-2072 ± 7	-1778 ± 7
0	-398 ± 3	-341 ± 3

A vzhledem k tomu, že interakce řetězců s ionty s klesající koncentrací klesá a voda je vůči iontům komplementární, opět není překvapením, že pokud se srovnají průměrné hodnoty energie interakcí řetězců s vodou (Tab. 3), je zde opačný trend – čím vyšší koncentrace iontů, tím méně řetězce reagují s vodou.

Tab. 3 – Srovnání průměrné hodnoty energie interakcí řetězců s vodou pro oba typy uspořádání řetězců a všechny koncentrace soli

c(NaCl) [mol/dm ³]	E _{nevazebná} [kcal/mol]	
	fixované	nefixované
1	-8291 ± 8	-8325 ± 7
0.6	-8710 ± 11	-9113 ± 8
0.2	-10015 ± 7	-9958 ± 11
0	-10690 ± 40	-11068 ± 11

A opět, při srovnání fixovaných a nefixovaných řetězců, jsou při 0,2M a 0M koncentracích soli interakce fixovaných řetězců s vodou větší a naopak při 0,6M a 1M koncentracích jsou větší interakce nefixovaných řetězců s vodou.

A opět se nabízí otázka: Proč se trend mění právě při 0,6M koncentraci soli?

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo popsat nevazebné interakce mezi řetězci hyaluronanu ve vodném prostředí s různou koncentrací soli, s konkrétním zaměřením na četnost tvorby intermolekulárních vodíkových vazeb, v závislosti na koncentraci sodných iontů v okolní vodě. Simulovány byly dva řetězce hyaluronanu, kdy každý obsahoval 24 monomerů (tj. 48 monosacharidových jednotek). Simulace probíhaly pro dva různé typy vzájemného uspořádání řetězců – nefixovaný a fixovaný (zavedený pro omezení vlivu náhodného vzdálení) model, a pro každý z nich ve čtyřech různých koncentracích NaCl: 1M, 0,6M, 0,2M a 0M (systém pouze neutralizován sodnými ionty).

Bylo zjištěno, že koncentrace soli má na počet intermolekulárních vodíkových vazeb velký vliv. Pokud jsou v okolí řetězců hyaluronanů sodné ionty, řetězce spolu interagují a mezi řetězci se tvoří intermolekulární vodíkové vazby. Naproti tomu pokud v okolí sůl není, nebo je jí jen zanedbatelné množství (jako tomu bylo u 0M koncentrace), ke vzájemné interakci řetězců téměř nedochází a vodíkové vazby se netvoří.

Během zkoumání mechanismů, kterými sodné ionty přispívají k interakci řetězců, bylo zjištěno, že ionty ovlivňují interakci řetězců s vodou a (pravděpodobně v důsledku toho) také míru deformace řetězců. U modelu s částečně fixovanými řetězci proto na výsledek měla vliv i samotná fixace řetězců a naopak u modelu s nefixovanými řetězci to, že fixovány nebyly. V důsledku všech těchto faktorů se u nefixovaných řetězců tvořilo nejvíce intermolekulárních vazeb při 0,2M koncentraci soli, zatímco u fixovaných řetězců to bylo při 0,6M koncentraci soli.

Dále bylo zjištěno, že interakce sodných iontů s řetězci a interakce molekul vody s řetězci jsou komplementární – navzájem se téměř dokonale zrcadlí a tedy pokud reagují řetězce s ionty, méně reagují s vodou a naopak. Také bylo možné vypořádat, že při různé intenzitě nevazebné interakce řetězců se sodnými ionty existují tři různé typy vzájemného natočení monosacharidů, mezi kterými intermolekulární vazba vzniká.

Tím nejdůležitějším závěrem této práce je tedy především samotný fakt, že počet intermolekulárních vazeb mezi hyaluronany závisí na koncentraci soli a že pokud v systému ionty nejsou, téměř žádné vodíkové vazby nevznikají – poznatek, který bylo možné najít jak u fixovaných řetězců, tak u jejich nefixovaných protějšků.

Vliv sodných iontů je přitom podle všeho globální (narušují vodu v okolí makromolekul), žádný lokální vliv konkrétních iontů na tvorbu a počet vazeb se najít nepodařilo.

Do budoucna by bylo jistě přínosné podrobněji prozkoumat to, proč se při 275 K některé trendy mění právě za 0,6M koncentrace soli. V práci navržená hypotéza, že při 0,2M koncentraci soli je sodných iontů v okolí hyaluronanů ještě příliš málo a při 1M koncentraci už naopak moc a navzájem se z okolí hyaluronanů vypuzují, by mohla být dobrým odrazovým můstkem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J., Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 2008 (8), str. 397-411.
- [2] Almond A., Sheehen J. K., Brass A., Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology*, 7, 1997, str. 597-604.
- [3] Hascall, V. C., Majors, A. K., de la Motte, C. A., Evanko, S. P., Wang, A., Drazba, J. A., Strong, S. A., Wight, T. N., Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1673, 2004, str. 3-12.
- [4] Toole, B. P., Wight, T. N., Tammi, M. I., Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 2002 (7), str. 4593-4596.
- [5] Laurent, T. C., Fraser, J. R., Hyaluronan. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 6, 1992 (7), str. 2397-2404.
- [6] Ingr M., Kutalkova E., Hrcirik J., Hyaluronan random coils in electrolyte solutions – a molecular dynamics study. *Carbohydrate Polymers*, 170, 2017, str. 289-295.
- [7] Ivanov, D., Neamtu, A., Molecular dynamics evaluation of Hyaluronan interactions with dimethylsilanediol in aques solution. *Revue Roumaine de Chimie*, 2013, str. 229-238.
- [8] Sheehan, J. K., Atkins, E. D. T., X-ray fibre diffraction study of conformational changes in hyaluronate induced in the presence of sodium, potassium and calcium cations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5, 1983 (4), str. 215-221.
- [9] Brown, M. B., Jones, S. A., Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19, 2005, str. 308-318.
- [10] Pelikán, V., Hora, P., *Paralelní výpočty v molekulární dynamice*. Ústav termomechaniky AV ČR, v.v.i., 2011. Dostupné z: https://ntc.zcu.cz/export/sites/ntc/download/Prezentace_polymerni_membrany/pelik_anxhora_paralelni_vypocty.pdf

- [11] Jungwirth, P., Molekuly a ionty v pohybu: Počítačové simulace biochemických a biofyzikálních procesů. *Chemické listy*, 108, 2014, str. 278-284.
- [12] Nagarajan, B., Viji Sankaranarayanan, N., Desai, R. U., Perspective on computational simulations of glycosaminoglycans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 9, 2019, str. 1-35.
- [13] Zelený, T., Sklenovský, P., Otyepka, M., *Úlohy do cvičení z výpočetní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/momo/skripta.pdf>
- [14] *Výukové materiály pro předmět Počítačová chemie, 7. přednáška* [online prezentace]. Národní centrum pro biomolekulární výzkum, Masarykova univerzita v Brně, [cit. 16.4.2019] Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/3148608/> nebo z: http://www.ncbr.muni.cz/~n19n/vyuka/pocitacova_chemie/#syl
- [15] Sklenovský, P., *Úvod do molekulárního modelování: Molekulová mechanika* [online prezentace]. Univerzita Palackého v Olomouci, [cit. 16.4.2019]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/momo/molekulova_mechanika.pdf
- [16] MacKerell, Jr. A., Empirical force fields for biological macromolecules. *Journal of Computational Chemistry*, 25, 2004, 1584-1604.
- [17] Otyepka, M., *Molecular Dynamics: classical MD of biomolecules*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2012. Dostupné z: http://fch.upol.cz/wp-content/uploads/2015/11/MOM_MD.pdf
- [18] Rapaport, D. C., *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. Cambridge University Press, 2004, 549. ISBN 9780521825689.
- [19] NAMD User's Guide Version 2.14 [online]. University of Illinois at Urbana-Champaign. Poslední aktualizace 20.12.2018 [cit. 27.2.2019]. Dostupné z: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
- [20] What is VMD? [online]. University of Illinois at Urbana-Champaign. Poslední aktualizace 20.12.2018 [cit. 27.2.2019]. Dostupné z: http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/allversions/what_is_vmd.html
- [21] Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., VMD – Visual Molecular Dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.

- [22] Almond A., Multiscale modeling of glycosaminoglycan structure and dynamics: current methods and challenges. *Current Opinion in Structural Biology*, 50, 2018, str. 58-64.
- [23] Garg, H. G., Hales, Ch. A., Chemistry and biology of hyaluronan [online kniha]. Amsterdam: Elsevier, 2004, 605. ISBN 9780080472225. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780080443829>
- [24] Gribbon P., Heng B.C., Hardingham T. E., The molecular basis of the solution properties of hyaluronan investigated by confocal fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical Journal*, 77, 1999, str. 2210-2216.
- [25] Gribbon P., Heng B.C., Hardingham T. E., The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. *Biochemical Journal*, 350, 2000, str. 329-335.
- [26] Hayashi, K., Tsutsumi, K., Nakajima, F., Norisuye, T., Teramoto, A., Chain-stiffness and excluded-volume effects in solutions of sodium hyaluronate at high ionic strength. *Macromolecules*, 28, 1995 (11), str. 3824-3830.
- [27] Bjoerling, M., Hersloef-Bjoerling, A., Stilbs, P., An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*, 28, 1995 (20), str. 6970-6975.
- [28] Mendichi, R., Šoltés, L., Giacometti Schieron, A., Evaluation of Radius of Gyration and Intrinsic Viscosity Molar Mass Dependence and Stiffness of Hyaluronan. *Biomacromolecules*, 4, 2003 (6), str. 1805-1810.
- [29] Sorci, G. A., Reed W. F., Effect of Valence and Chemical Species of Added Electrolyte on Polyelectrolyte Conformations and Interactions. *Macromolecules*, 37, 2004 (2), str. 554-565.
- [30] Sicinska, W., Adams, B., Werner, L., A detailed ¹H and ¹³C NMR study of a repeating disaccharide of hyaluronan: the effects of temperature and counterion type. *Carbohydrate Research*, 242, 1993, str. 29-51.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA	kyselina hyaluronová
GCU	kyselina β -D-glukuronová
NAG	β -D-N-acetylglukosamin
Å	ångström (jednotka délky)
MD	molekulová (molekulární) dynamika
E_{LJ}	Lennard-Jonesův potenciál
NMR	nukleární magnetická rezonance
NaCl	chlorid sodný
CaCl ₂	chlorid vápenatý
HB	vodíková vazba (z angl. hydrogen bond)
VdW	van der Waalsova
$E_{\text{nevazebná}}$	energie nevazebné interakce
T	čas
$c_{\text{(NaCl)}}$	koncentrace NaCl

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Chemická struktura hyaluronanu [1]	6
Obr. 2 – Trojnásobná levostranná šroubovice HA [7].....	7
Obr. 3 – Přehled složek potenciálové funkce (vazebných a nevazebných interakcí) [15]	10
Obr. 4 – Lennard-Jonesův potenciál [15]	10
Obr. 5 – Ukázka parametrů, které je potřeba nastavit při zadávání simulace.....	11
Obr. 6 – Princip periodických okrajových podmínek [17]	12
Obr. 7 – Ukázka výstupu z VMD – řetězce HA v zobrazení „licorice“, vodíkové vazby v zobrazení „Hbonds“ (žluté kroužky) a ionty v zobrazení „VdW“ (žluté koule).....	14
Obr. 8 – Model vody TIP3T	18
Obr. 9 – Počáteční konfigurace řetězců u všech simulovaných systémů	19
Obr. 10 – Detail monosacharidů uprostřed obou řetězců se zvýrazněnými fixovanými atomy uhlíku (fialově)	20
Obr. 11 – Počet intermolekulárních HB (modrá) a celková energie nevazebných interakcí mezi řetězci (oranžová) v závislosti na čase, pro 1M koncentraci soli a fixované řetězce	21
Obr. 12 – Energie elektrostatické interakce (modrá) a VdW interakce (oranžová) mezi fixovanými řetězci v závislosti na čase, pro 1M koncentraci soli	22
Obr. 13 – Počet intermolekulárních HB v závislosti na čase pro 1M (modře) a 0M (červeně) koncentraci soli a fixované řetězce	23
Obr. 14 – Počet intermolekulárních HB v závislosti na čase pro 0,6M (zeleně) a 0,2M (oranžově) koncentraci soli a fixované řetězce	23
Obr. 15 – Vzájemná poloha cyklů monosacharidových jednotek typu B (vlevo), typu T (uprostřed) a typu R (vpravo)	23
Obr. 16 – Graf počtu HB (modrá) a energie nevazebné interakce řetězců s ionty (oranžová) v závislosti na čase pro 1M koncentraci a fixované řetězce	24
Obr. 17 – Závislost VdW energie (žlutá) a celkové nevazebné energie (oranžová) mezi ionty a fixovanými řetězci hyaluronanu (při koncentraci soli 0,6M) na čase u fixovaných řetězců.....	25
Obr. 18 – Časové závislosti nevazebných energií vody (modře) a sodných iontů (žlutě) vůči hyaluronanům pro 1M koncentraci NaCl a fixované řetězce	26

Obr. 19 – HB typu B s vodou v okolí, ale nikoliv mezi řetězci.....	26
Obr. 20 – Části nefixovaných řetězců mimo definovaný box molekul vody (pro přehlednost jsou atomy v řetězcích zobrazeny pomocí van der Waalových sfér).....	27
Obr. 21 – Časový vývoj počtu intermolekulárních HB (modrá) a velikosti energie nevazebných interakcí mezi řetězci (oranžová) pro 0,2M koncentraci a nefixované řetězce	28
Obr. 22 – Časový vývoj počtu intermolekulárních HB pro 1M (modrá) a 0M (červená) koncentraci a nefixované řetězce	28
Obr. 23 – Časový vývoj počtu intermolekulárních HB pro 0,6M (zelená) a 0,2M (žlutá) koncentraci a nefixované řetězce	28
Obr. 24 – Graf vývoje počtu intermolekulárních HB (modrá) a energie nevazebné interakce řetězců s ionty (oranžová) v čase pro 0,6M koncentraci a nefixované řetězce.....	29
Obr. 25 – Časový vývoj počtu HB (modrá) a velikosti energie nevazebných interakcí nefixovaných řetězců s ionty z lokálního (oranžová) pohledu pro 0,2M koncentraci	30
Obr. 26 – Časový vývoj počtu HB (modrá) a velikosti energie nevazebných interakcí nefixovaných řetězců s ionty z globálního (žlutá) pohledu pro 0,2M koncentraci	30
Obr. 27 – Časové závislosti nevazebných interakcí vody (modrá) a sodných iontů (žlutá) s hyaluronany pro 1M koncentraci NaCl a nefixované řetězce	31
Obr. 28 – Srovnání nefixovaných řetězců v koncentraci 0,6M (vlevo) a 0,2M (vpravo)	32

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Srovnání průměrných počtů intermolekulárních HB pro oba typy uspořádání řetězců a všechny koncentrace soli	31
Tab. 2 – Srovnání průměrné hodnoty energie interakcí řetězců s ionty Na ⁺ pro oba typy uspořádání řetězců a všechny koncentrace soli.....	33
Tab. 3 – Srovnání průměrné hodnoty energie interakcí řetězců s vodou pro oba typy uspořádání řetězců a všechny koncentrace soli	33