

*Rezumat Teza de Doctorat*

**DEZVOLTAREA SPECTROMETRIEI DE MASĂ DE REZOLUȚIE  
ULTRAÎNALTĂ PENTRU IDENTIFICAREA GLICOCONJUGAȚILOR CU ROL DE  
BIOMARKER ÎN AMESTECURI COMPLEXE**

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr Alina-Diana Zamfir

Student doctorand:

Sabina-Raluca Ică

**Timișoara**

**2022**

## Cuprins

Introducere	18
Capitolul I.	
Considerații generale	22
1.1 Glicolipidele în sistemul nervos central	23
1.2 Spectrometria de masă. Ionizarea prin electrospray (ESI)	27
1.3 Spectrometria de masă de înaltă rezoluție	30
1.4 Tehnici de fragmentare ale ionilor	31
1.4.1 Disocierea indusă	31
1.4.2 Disocierea prin transfer de electroni (ETD). Disocierea prin captura de electroni (ECD)	32
Capitolul II.	
Materiale, metode și echipamente utilizate	35
2.1 Materiale și solvenți	36
2.2 Probe biologice analizate	38
2.2.1 Extras nativ de ganglioziide din Cerebel uman	38
2.2.2 Extract nativ de ganglioziide din cortexul motor uman	38
2.2.3 Extract nativ de ganglioziide din tumoare cerebrală	39
2.2.4 Extract nativ de ganglioziide din țesut hipocampal afectat de epilepsie temporală și țesut hipocampal fără modificări neuropatologice	40
2.3 Extracția și purificarea ganglioizidelor	40
2.4 Abrevierea ganglioizidelor și atribuirea lor în spectrele de masă	41
2.5 Metode și Aparatura Utilizată	43
2.5.1 Cromatografie de lichide de înaltă performanță (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	43
2.5.2 Cromatografia în strat subțire (thin layer chromatography, TLC)	47
2.5.3 Spectrometrie de masă. Orbitrap	49
2.5.4 Alte aparate utilizate	51
CAPITOLUL III.	
Rezultate experimentale și discuții	53

3.1 Dezvoltarea și optimizarea spectrometriei de masă de înaltă rezoluție cu capcană orbitală pentru identificarea unor biomarkeri ai cerebelului uman	54
3.1.1 Importanța studiului	54
3.1.2 Condiții experimentale	55
3.1.3 Screening-ul comparativ al amestecurilor de ganglioziide C15gw, C40gw și C65y	55
3.1.4 Caracterizarea structurală prin HCD tandem MS	69
3.1.5 Concluziile parțiale ale studiului	74
3.2 Optimizarea și aplicarea spectrometriei de masă de înaltă rezoluție în stagii multiple pentru evaluarea glicolipidomului specific cortexului uman	76
3.2.1 Motivația studiului	76
3.2.1 Condiții experimentale	78
3.2.2 Screening-ul prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție	78
3.2.3 Caracterizarea structurală prin HCD	86
3.2.4 Concluziile parțiale ale studiului	89
3.3 Optimizarea spectrometriei de masă de înaltă rezoluție pentru descoperirea și caracterizarea markerilor tumorilor cerebrale	92
3.3.1 Importanța studiului	92
3.3.2 Scopul studiului	93
3.3.3 Condiții experimentale	95
3.3.4 Screening-ul prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție	95
3.3.5 Caracterizarea structurala prin CID	105
3.3.6 Concluziile parțiale ale studiului	110
3.4 Analiza gangliozidomului unui hipocampus uman în lobul temporal afectat de Epilepsie descris cu ajutorul Spectrometrie de masă de înaltă rezoluție	112
3.4.1 Importanța studiului	112
3.4.2 Condiții experimentale	113
3.4.5. Analiza structurală MS/MS a speciilor GQ1 prin disociere prin ciocnire la energii înalte (HCD)	129
Capitolul IV.	
Concluzii finale	137



## ***Mulțumiri***

Aș dori să îmi exprim în mod special recunoștința și mulțumirile pentru sprijinul acordat pentru înțelegerea, răbdarea, munca asiduă și încrederea arătate atât pe parcursul activității mele științifice, cât și pe perioada elaborării și finalizării prezentei lucrări, doamnei Prof. Univ. Dr. Alina D. Zamfir, în calitate de conducător științific al tezei de doctorat.

Mulțumesc pentru sfaturile, sugestiile și recomandările primite pe perioada desfășurării anilor de doctorat stimaților membrii ai echipei de îndrumare formată din domnul Prof. dr. Mihail Lungu, Conf. dr. Marin Cătălin, Lect. dr. Adrian Neculae.

Aș dori, de asemenea, să subliniez aportul și ajutorul acordat în mod continuu de către Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Electrochimie și Materie Condensată din Timișoara, care cu deosebită bunăvoință și înțelegere mi-a acordat sprijinul financiar pentru deplasările la numeroasele conferințe științifice internaționale, precum și la stagiile de cercetare atât în țară cât și în Statele Unite ale Americii.

Mulțumesc pe această cale domnului Prof. dr. Daniel Vizman, directorul Școlii Doctorale a Facultății de Fizică din cadrul Universității de Vest din Timișoara, care m-a îndrumat în obținerea unui contract financiar din fonduri suport pentru formarea profesională a doctoranzilor.

Le mulțumesc mult grupului de colegi și cercetători de la INCEMC în special Dr. Mirela Sarbu pentru suportul și îngăduința pe care mi-a acordat-o și pentru ajutorul constant acordat pe parcursul anilor de cercetare.

Doresc să mulțumesc familiei pentru susținerea și sprijinul fără rezerve pe toată durata acestor ani, și pentru că mi-au fost alături necondiționat.

Cuvinte cheie: Spectrometrie de masă Orbitrap, Ganglioziide, rezoluție înaltă, cerebel, cortex motor, hemangioma, epilepsie.

## *Introducere*

În momentul de față, metodele de investigare și de diagnostic precoce pentru bolile neurodegenerative precum și pentru tumori, cu precădere a tumorile cerebrale, se impun a fi dezvoltate în mod continuu, astfel **spectrometria de masă de înaltă rezoluție** contribuie la îmbunătățirea acestor metode.

Până în acest moment, cunoaștem puține lucruri despre modul în care se comportă anumite celule ale corpului uman pentru a activa bolile neurodegenerative sau pentru a favoriza multiplicarea celulelor tumorale, astfel încât este necesar să se dezvolte tehnici analitice de mare capacitate și strategii superioare în măsură să identifice markerii biochimici care descriu diferite patologii clinice implicate în astfel de procese.

Medicina modernă a dezvoltat de-a lungul timpului metode de diagnostic și investigare atât a bolilor neurodegenerative cât și a tumorilor cerebrale, printre aceste metode se numără:

i) scanarea prin tomografie computerizată (CT), care deși este o metodă non- invazivă, este o metodă relevantă doar în cazul tumorilor;

ii) Rezonanța Magnetică Nucleară (RMN) sau Imagistica prin Rezonanță Magnetică (IRM) care face distincție între diferite structuri anatomice și evaluează în detaliu anatomia acestora;

iii) Tomografia prin Emisie de Pozitroni (PET CT) o metodă de imagistică moleculară, care poate oferi informații cu privire la funcționalitatea țesuturilor. Cu toate acestea, trebuie specificat că rezoluția spațială și temporală este limitată ceea ce conduce la omiterea structurilor mici.

Chiar dacă aceste metode sunt noninvazive și au o precizie destul de bună în diagnosticarea corectă a diferitelor patologii, în ultimii ani medicina moleculară ajutată de științele "omice" au contribuit foarte mult la îmbunătățirea diagnosticării precoce, chiar înainte de apariția simptomelor specifice, prin descoperirea de biomarkeri moleculari caracteristici pentru tot mai multe afecțiuni. Astfel de markeri moleculari pot să evidențieze boala înainte de declanșarea propriu zisă a acesteia, ceea ce conduce la un pronostic mai bun al speranței de viață și o gestionare mai eficientă a tratamentului.

Ținta fizicii medicale este de a identifica markeri moleculari din fluidele corpului, lichid cefalorahidian, sânge, salivă, lacrimi, urină. Întru-cât, aceștia sunt exprimați în concentrație destul de mare în lichidul cefalorahidian (CLR), dar prelevarea acestuia necesită o indicație medicală

precisă și reprezintă o procedură invazivă, se fac eforturi deosebite pentru a putea stabili setul de biomarkeri din sânge.

Această lucrare este structurată în patru capitole, astfel:

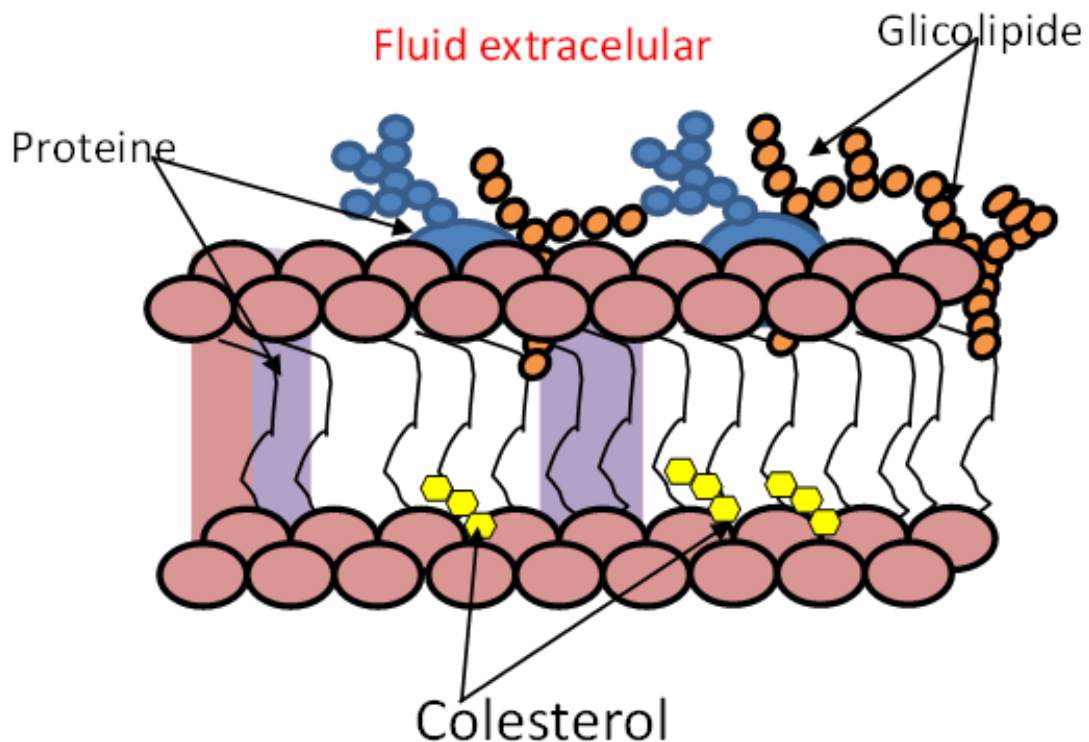
**Primul capitol** intitulat *Considerații Generale*, am descris glicolipidele în special gangliozele și rolul lor în funcțiile cerebrale precum și metodele de analiza ale acestora, cu precădere fenomenul de ionizare prin electrospray și importanța acestui fenomen în caracterizarea biomoleculilor mari, respectiv tehnicile de fragmentare cu ajutorul cărora obținem date importante despre structura acestor molecule.

Gangliozele fac parte din grupul glicosfingolipidelor cu o structură complexă, au în componența lor o ceramidă (formată dintr-o bază sfingoidă și un acid gras), legată glicozidic de un lanț oligozaharidic care conține o formațiune de glucoză și una sau mai multe unități de acid sialic.

Gangliozele sunt întâlnite la toate mamiferele, atât în țesuturi cât și în lichidele corpului, cercetările au demonstrat că în sistemul nervos central, creier, măduva spinării, lichidul cefalorahidian se găsesc în concentrație mai mare, ele reprezentând 6% din masa lipidelor din creier față de restul țesuturilor unde apar în concentrație mai mică.

Se găsesc cu precădere în partea exterioară a membranei plasmatică, sinteza lor începe în reticulul endoplasmatic cu ceramida care este apoi transferată cu ajutorul proteinelor de transfer în aparatul Golgi care o transformă în glucosilceramide (GlcCer).

Membrana celulară este limita dintre partea interioară și cea exterioară a celulei. Ca urmare, aceasta are rolul de a gestiona circulația diferitelor molecule - cum ar fi proteinele, glicoproteinele, ioni, apă, aminoacizi, - în interiorul și în afara celulei, așa cum se poate vedea în Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Structura membranei celulare redată sub forma unei diagrame

În ultimii ani, studii avansate realizate folosind metode moderne de genetică și neuroimagistică, cum ar fi imagistică prin rezonanță magnetică (IRM) au indicat că cerebelul uman susține și funcții autonome, limbice și cognitive, inclusiv limbajul și gândirea; prin urmare, această regiune a creierului a fost în ultima vreme asociată cu apariția și dezvoltarea autismului. Pe baza datelor colectate prin testare genetică și/sau folosind metode RMN, alte rapoarte se referă, de asemenea, la disfuncțiile cerebeloase asociate cu boala Alzheimer (AD), tulburarea de deficit de atenție / hiperactivitate, boala Huntington, ataxia ereditară și boala Parkinson (PD).

Spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HR MS) este cea mai performantă opțiune pentru determinarea cu cea mai mare acuratețe a diverselor substanțe de analizat într-o mare varietate de matrici umane. Acest principiu care deosebește HR MS de spectrometria de masă convențională cu rezoluție "unică" își are bazele în fizica atomică, mai exact în energiile de legare nucleară diferite pentru fiecare izotop al fiecărui element, conducând astfel la "defectul de masă" care reprezintă diferența dintre masa exactă și masa nominală.



În principiu, spectrometria de masă de înaltă rezoluție presupune determinarea cu cea mai mare acuratețe posibilă a maselor măsurate; definiția acurateței este exprimată în părți/milion și se calculează după cum urmează în relația:

$$\text{Ppm} = \frac{1 \cdot 10^6 (\text{masa măsurată} - \text{masa teoretică})}{\text{masa teoretică}}$$

Rezoluția unui instrument este dependentă de mai mulți parametri, printre care se numără: masa la care se măsoară timpul de achiziție, prin urmare masa trebuie menționată întotdeauna în contextul rezoluției, precum și calibrarea instrumentului de înaltă rezoluție.

Spectrometrele de masă de tipul Orbitrap efectuează măsurători de înaltă rezoluție prin măsurarea frecvenței la care ionii oscilează în capcana orbitală. Cu toate acestea, trebuie menționat totuși că rezoluția înaltă se atinge în defavoarea vitezei de scanare.

Masa moleculară este un parametru implicit care oferă informații referitoare la identitatea unei molecule. Spectrometria de masă (MS) este o tehnică de analiză care asigură măsurători precise ale masei chiar și din cantități foarte mici de probe foarte complexe care conțin substanțe analitice ce se încadrează într-o gamă largă de dimensiuni și concentrații moleculare. Spectrometria de masă de înaltă rezoluție oferă, pe lângă determinarea masei moleculare a unui eșantion analizat, descoperirea particularităților structurale ale speciilor de interes cu ajutorul spectrometriei de masă în tandem (MS/MS).

CID (Collision-Induced Dissociation) este o metodă de spectrometrie de masă pentru a genera ioni fragment, ionul precursor sau ionul părinte este accelerat prin aplicarea unui câmp electric care îi crește energia cinetică și apoi este lăsat să intre în coliziune cu moleculele unui gaz neutru (azot, argon sau heliu). În timpul ciocnirii, energia cinetică este transformată în energie internă, ceea ce va duce la "spargerea" ionului molecular în fragmente mai mici, aceste fragmente vor fi analizate apoi prin spectrometrie de masă.

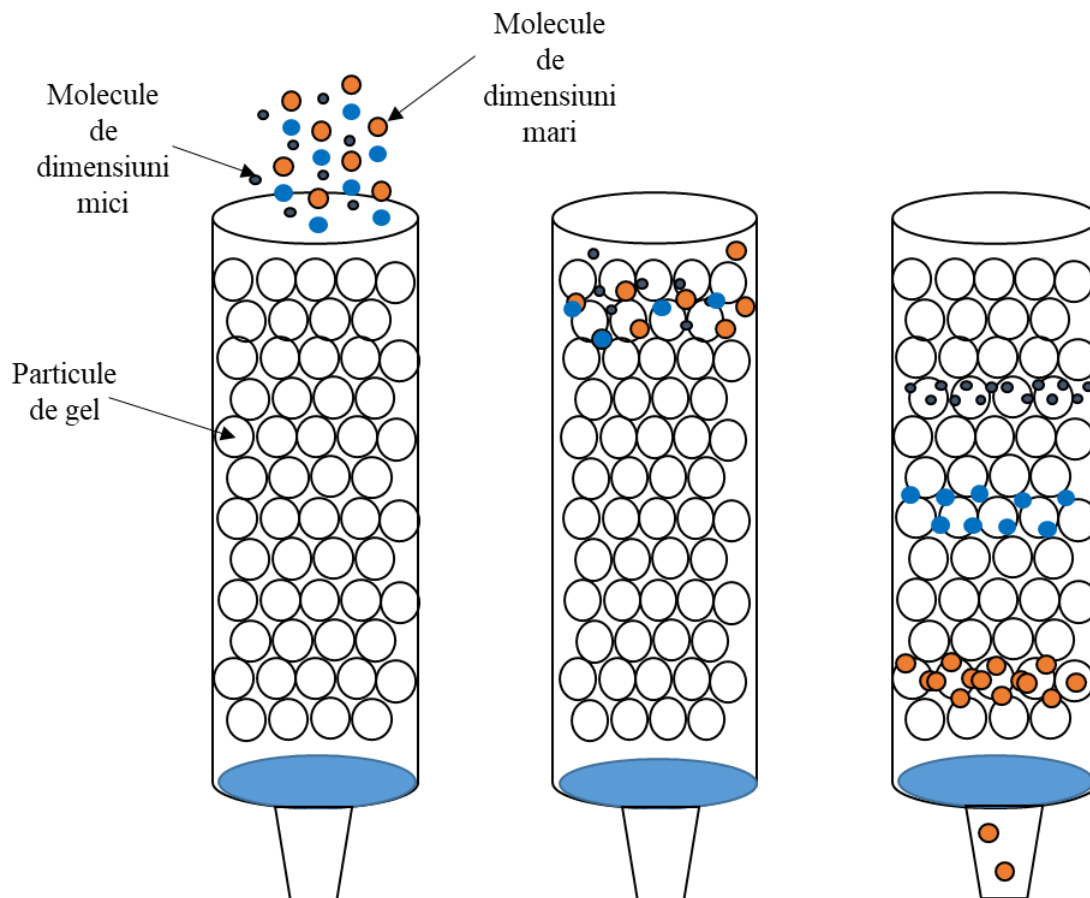
ETD (Electron Transfer Dissociation) este o tehnică de fragmentare ce se efectuează prin transferul de electroni către moleculele multiplu încărcate, permițând astfel secvențierea biomoleculelor, cum ar fi proteinele sau peptidele.

Fragmentarea prin captare de electroni presupune că moleculele multiplu-protonate interacționează cu electronii liberi pentru a forma ioni, iar eliberarea de energie potențială electrică are ca rezultat fragmentarea ionului produs.

**Capitolul II** denumit *Materiale, metode și echipamente utilizate* exemplifică informațiile referitoare la toate dispozitivele, eșantioanele și substanțele reactive folosite în cadrul studiilor prezentate în această teză, precum și nomenclatorul, metoda de calcul a maselor moleculare și a maselor fragmentelor ionice obținute.

În cazul de față, informația structurală reprezintă scopul analizei, ionizarea simultană a mai multor specii moleculare trebuie evitată. Filtrarea pe gel bazată pe Sephadex permite separarea grupurilor de biomolecule care sunt peste limita de excludere a mediului, de contaminanți precum săruri și coloranți. Sephadex este preparat prin reticulare cu dextran și epiclorigidrina.

Sephadex G-25 are un interval de fracționare pentru moleculele globulare de mase moleculare cuprinse între 1000 Da și 5000 Da, cu o limită de excludere de aproximativ 5000.



**Figura 2.1.1** Schema de separare a moleculelor de diferite dimensiuni prin filtrare pe gel

Moleculele sunt eluate în ordinea descrescătoare a mărimii moleculare. Masa moleculară a celei mai mici molecule care nu poate pătrunde prin porii unui anumit gel se numește "limita de excludere" a gelului.

Amestecurile de ganglioziide native analizate în acest studiu au fost purificate din țesut cerebral, provenite de la fetoși aflați în diferite stadii de dezvoltare intrauterină, respectiv a 15-a (notată C15gw) și a 40-a (C40gw) săptămână de gestație și de la un bărbat în vârstă de 65 de ani (C65y), decedat în urma unui stop cardiac, ca urmare a unei boli coronariene.

Proba de țesut prelevată din țesutul cortexului normal provenit de la un subiect sănătos în vârstă de 17 ani, decedat în urma unui accident va fi notată în continuare cu MC17. Examinarea morfoanatomică și histopatologică a indicat că țesutul MC17 era normal. Conform examinării morfoanatomice și histopatologice, țesuturile nu prezentau semne patologice. Biopsiile C15gw și C40gw au fost obținute în timpul unei acțiuni pedopatologice de rutină, examinate prin autopsie la Spitalul Clinic de Obstetrică și Ginecologie "Petrova", în timp ce C65y și MC17 a fost prelevat la Departamentul de Medicină Legală și Criminologie, Facultatea de Medicină, Universitatea din Zagreb, Croația.

Hemangiomul cavernos cerebral (notat în continuare cu HE42) localizat în emisfera dreaptă a cortexului frontal la un pacient adult de sex masculin, în vârstă de 42 de ani, a fost diagnosticat clinic cu ajutorul tomografiei computerizate (CT) și imagisticii prin rezonanță magnetică (IRM). Specimenul de tumoră cerebrală a fost obținut în timpul procedurii chirurgicale. Diagnosticul histopatologic de hemangiom cavernos a fost confirmat cu ajutorul colorației cu hematoxilină și eozină. Această analiză a indicat faptul că țesutul tumoral era compus din țesut conjunctiv celular și spații sanguine cu pereți de grosime variabilă, acoperite cu endoteliu simetric și umplute cu eritrocite. Proba de țesut utilizată pentru analiza biochimică și extragerea gangliozidelor a fost cântărită și depozitată la -20 °C după îndepărtarea cu grijă a vaselor de sânge și a elementelor necrotice. Permisivitatea pentru experimentele cu țesut uman în scopuri științifice a fost obținută de la Comisia de etică a Facultății de Medicină din Zagreb, în cadrul proiectului 108120 finanțat de Ministerul Croat al Științei și Tehnologiei.

Au mai fost analizate și eșantioane de țesut hipocampal afectate de epilepsie temporală și de eșantioane de țesut de control hipocampal fără modificări neuropatologice. Pacientul cu epilepsie temporală (de sex feminin, în vârstă de 28 de ani) a avut antecedente de crize parțiale complexe și refractară la medicația antiepileptică. Imagistica prin rezonanță magnetică cerebrală

a evidențiat scleroză hipocampală pe partea dreaptă, astfel că a fost indicată amigdalohippocampectomia selectivă. Examenul neuropatologic a confirmat diagnosticul clinic. Țesutul hipocampal de control a făcut parte din colecția de țesut cerebral uman de la Institutul Croat pentru Cercetarea Creierului, Școala de Medicină a Universității din Zagreb, și a fost obținut în urma autopsiei de rutină a unei persoane care a murit din cauze care nu au legătură cu afecțiuni neurologice (bărbat, în vârstă de 63 de ani). Toate țesuturile au fost congelate imediat în azot lichid și depozitate la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la procedurile analitice ulterioare. Studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki și a fost aprobat de comisiile de etică ale spitalului universitar Sestre Milosrdnice, Zagreb (EP-7259/17-17) și a Școlii de Medicină a Universității din Zagreb (641-01/17-02/01), cu care am colaborat în cadrul mai multor proiecte.

Având în vedere complexitatea structurală și compozițională a gangliozidelor, până în prezent nu a fost încă dezvoltat un software care să poată asigura desemnarea și interpretarea automată a ionilor detectați prin spectrometrie de masă, însă pe baza rezultatelor anterioare în domeniul glicolipidelor am întocmit o baza de date ce cuprinde majoritatea structurilor existente.

În cadrul acestor studii, spectrele de masă au fost desemnate prin calcul efectiv, metoda de calcul fiind descrisă mai jos.

Calcularea maselor moleculare din datele spectrale obținute prin ESI MS:

- i) stabilirea gradului de încărcare al ionilor detectați;
- ii) calcularea maselor moleculare;
- iii) corelarea maselor moleculare cu formulele moleculare;
- iiii) calcularea acurateții în determinarea masei;

Pentru asocierea gangliozidelor, s-a aplicat sistemul de abreviere introdus de Svennerholm, împreună cu recomandările Comisiei IUPAC-IUB pentru nomenclatură biochimică (IUPAC-IUB 1998), după cum urmează:

GA3 -  $\text{II}^3\text{-LacCer}$ ; GM1 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-Neu5Ac-Gg}_4\text{Cer}$ ; GM2 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-Neu5Ac-Gg}_3\text{Cer}$ ; GM3 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-Neu5Ac-LacCer}$ ; GM4 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-Neu5Ac-GgCer}$ ; GD1 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_2\text{-Gg}_4\text{Cer}$ ; GD2 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_2\text{-Gg}_3\text{Cer}$ ; GD3 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_2\text{-LacCer}$ ; GT1 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_3\text{-Gg}_4\text{Cer}$ ; GT2 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_3\text{-Gg}_3\text{Cer}$ ; GT3 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_3\text{-LacCer}$ , GT4 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_3\text{-GgCer}$ ; GQ1 -  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-(Neu5Ac)}_4\text{-Gg}_4\text{Cer}$ .

Ionii moleculari au fost atribuiți speciilor de gangliozide prin calculul exact al masei și pe baza informațiilor dobândite anterior despre acest tip de glicoconjugate și a criteriilor de biosinteză

cunoscute. Atribuirea ionilor fragment a corpului oligozaharidelor generate în cadrul experimentelor de fragmentare HCD MS<sup>2</sup> a urmat nomenclatura introdusă de Domon și Costello și revizuită de Costello și colab.

Deoarece lansarea inițială a primului spectrometru de masă bazat pe Orbitrap în 2005, nevoile în expansiune ale comunității spectrometriei de masă au stimulat în mod continuu la dezvoltarea tehnologiilor MS bazate pe Orbitrap.

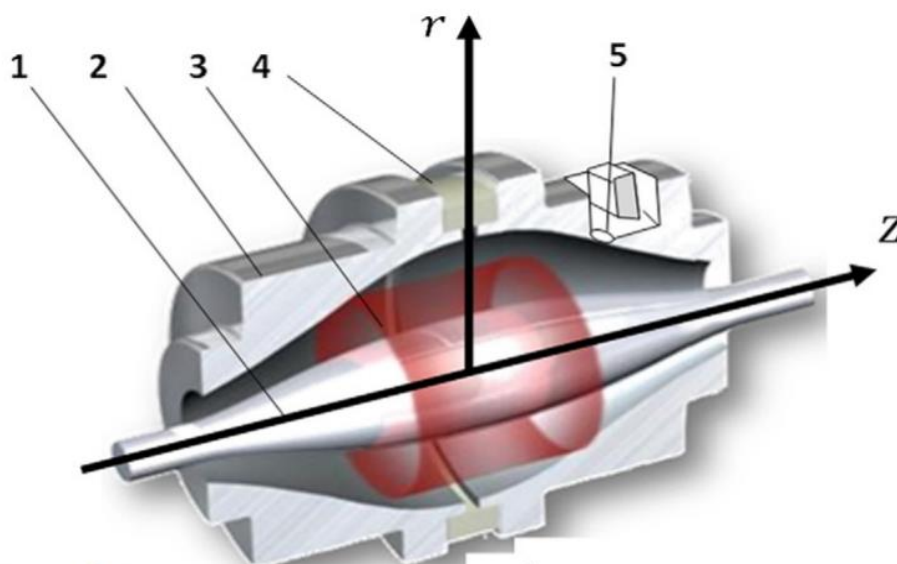
Ionii pozitivi au fost stocați în capcană pentru o perioadă lungă de timp, în timp ce se roteau în jurul firului, deoarece conservarea momentului cinetic nu le-a permis să cadă pe sârmă. În deceniile următoare, acest principiu a fost dezvoltat, iar Knight a echipat capcana lui Kingdon cu o pereche de electrozi pozitivi conici, care au restricționat, de asemenea, efectul de mișcarea ionilor în direcție longitudinală.

Knight a introdus astfel aproximarea quadru-logaritmică, Ecuația 2.4, pentru a descrie câmpul potențial electrostatic al acestui nou model de capcană

$$\Psi(z,r)=C_1\left(z^2 - \frac{r^2}{2} + R_m^2 \ln \frac{r}{R_m}\right) + C_2 \quad (2.4)$$

Unde  $R_m$  este un parametru geometric, iar  $C_1$  și  $C_2$  sunt constante.

Această aproximare satisface ecuația Laplace. Perechea de electrozi asimetrici au forma prezentată în Figura 2.6.



**Figura 2.5.4** Capcana ionica. (1) Electroful interior (2) electroful exterior, (3) orbitele ionice, (4) inelul de izolare care separă două secțiuni ale electroful exterior, (5) deschiderea tangențiala pentru injecția de ioni.

**Capitolul III** numit *Rezultate experimentale și discuții* prezintă rezultatele experimentale originale, legate de cartografierea ganglioizidomului cerebelului uman în diferite stagii de dezvoltare ale acestuia, caracterizarea ganglioizidomului cortexului motor uman, determinarea și descoperirea compoziției structurii markerilor de tip glicolipidici în tumori cerebrale. Cercetarea s-a mai orientat și spre evaluarea modificărilor în modelul ganglioizidelor în hipocampusul adult afectat de TLE în comparație cu hipocampusul normal, detectând structurile specifice TLE și completând caracterizarea ganglioizidomului asociat TLE.

În primele studii, am dezvoltat o abordare bazată pe spectrometria de masă de înaltă rezoluție, pentru a putea caracteriza schimbările ce apar în structura “ganglioizidomului” uman odată cu dezvoltarea și îmbătrânirea creierului uman. Experimentele s-au bazat pe screening-ul comparativ și analiză structurală a ganglioizidelor exprimate în creierul fetal și adult, și s-au efectuat cu ajutorul spectrometrului de masă Orbitrap în tehnica ionilor negativi.

Platforma de rezoluție ultraînaltă a permis discriminarea a 159 de ioni corespunzători a 120 de specii distincte de ganglioizide, fără a fi necesară o separare anterioară a amestecurilor native de ganglioizide obținute din biopsiile cerebelului fetal și adult, un număr mult mai mare față de experimentele realizate până acum.

O evaluare detaliată a spectrelor de masă și a datelor sistematizate arată că parametrii de screening au favorizat procesul de multicharging, ceea ce reprezintă o caracteristică pozitivă, nu numai utilă pentru o fragmentare eficientă a ionului precursor prin MS/MS, ci și o confirmare a faptului că setul definit de tensiuni nanoESI au fost blânde și, prin urmare, adecvate și pentru a preveni fragmentarea în sursă a atașamentelor labile, cum ar fi Neu5Ac și Fuc.

Experimentele HCD MS/MS efectuate folosind aceiași ioni precursori corespunzători GD3 (d18:1/18:0) și GQ1 (d18:1/18:0) detectate în toate extractele analizate aici, nu au evidențiat nicio diferență structurală de la o probă la alta. Aceste constatări ar putea sugera că, în timp ce expresia diferitelor specii în țesutul cerebelos este strâns legată de faza de dezvoltare, structura lor intimă nu este modificată. Cu siguranță, urmează să fie efectuate cercetări mai detaliate pentru elucidarea acestui aspect.

Comparația cerebel fetal față de cerebelul adult a dezvăluit diferențe semnificative în speciile de ganglioizide exprimate, care sunt atribuibile procesului neurodezvoltării și ar putea fi utilizate în consecință ca markeri ai îmbătrânirii cerebelului. Pe lângă descoperirile precedente, care au arătat că densitatea ganglioizidelor în cortex crește brusc în ultimul trimestru de dezvoltare fetală, datele noastre coroborează o complexitate structurală ridicată a ganglioizidelor cerebeloase fetale, în special în ultimul trimestru al vieții intrauterine și în jurul termenului.

Cortexul motor (MC) este regiunea creierului responsabilă de execuția mișcării corpului, această zonă generează și transmite semnalul mișcării către toți mușchii voluntari ai corpului, care se contractă pentru a genera mișcare și executarea mișcării. Prin urmare, această zonă joacă un rol fundamental în efectuarea oricărei activități fizice și în programarea secvențelor care conduc la mișcări efectuate în mod coordonat. Leziunile la MC sau modificările patologice în compoziția sau structura componentelor chimice exprimate la acest nivel au repercursiuni grave asupra vieții.

O analiză amănunțită a spectrelor a dus la identificarea a nu mai puțin de 89 de ioni. În mod interesant, rezultatele arată că MC17 este caracterizat de specii de ganglioizide care prezintă o mare diversitate de compoziții de lanțuri glicanice și ceramide, precum și componente relevante din punct de vedere biologic modificate de *O*-acetilare, gruparea fucosil sau atașarea ionilor  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ .

Evident, proba analizată este caracterizat de un grad de sialilare mult mai ridicat decât cel cunoscut anterior, fiind dominat, în mod esențial de structuri polisialilate care prezintă lanțuri lungi de zaharide, din clasa G1.

HCD a generat un set de ioni de diagnosticare, cărora li s-a atribuit o precizie medie excelentă a masei de 2 ppm; acești ioni de secvență documentează structura lanțului zaharidelor, starea de sialilare, pozițiile de-a lungul lanțului celor trei monozaharide Neu5Ac, precum și compoziția generală a ceramidei.

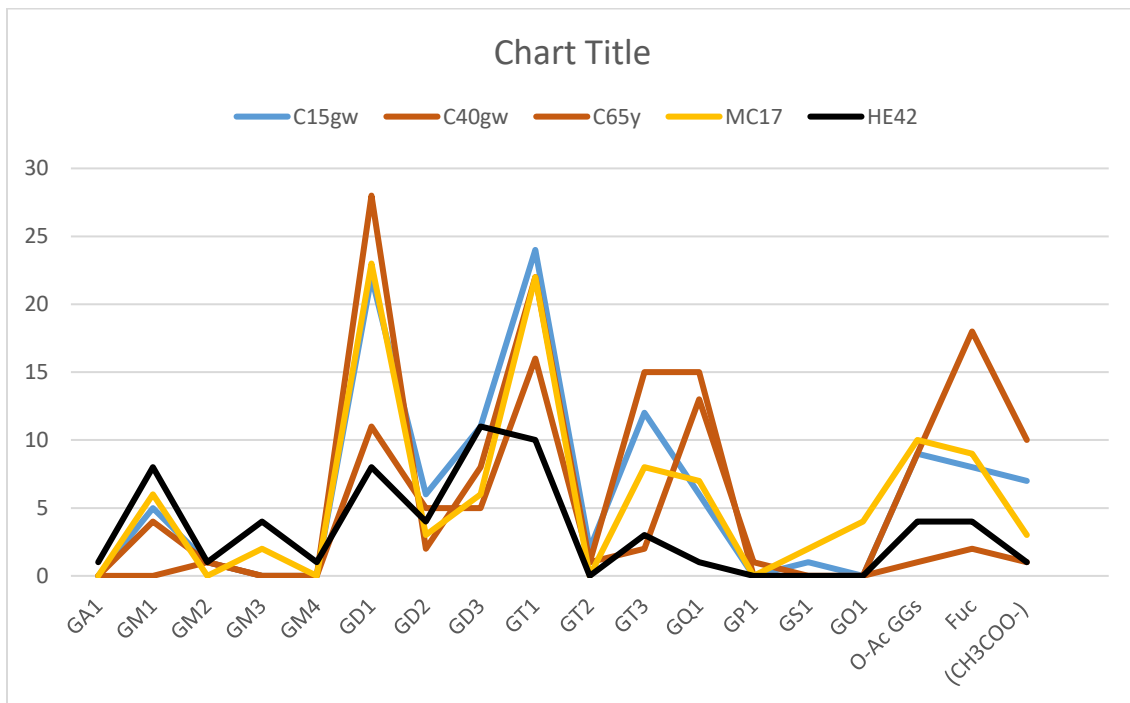
Datorită puterii de rezoluție ridicate și măsurării precise a masei atât în profilarea MS, cât și în fragmentarea MS / MS, am putut colecta date compoziționale și structurale noi legate de ganglioizidomul MC uman, fără a fi necesară separarea înainte de MS, care ar fi prelungit timpul analizei și interpretarea ulterioară a datelor. Din acest motiv, considerăm că MS HR cu capcană orbitală cea mai rapidă și sensibilă metodă pentru investigarea probelor clinice în general și pentru determinarea fiabilă a biomarkerilor ganglioizidici în biopsiile cerebrale în special.

Hemangioamele sunt cele mai frecvente, în general benigne, caracterizate prin dilatarea vaselor de sânge. Aceste tumori apar frecvent în copilărie, fiind uneori inofensive și asimptomatice. Cu toate acestea, leziunile simptomatice pot provoca hemoragii, ulcerații sau perturbarea funcțiilor organelor afectate.

În paralel cu procedurile imagistice, în ultimii ani, pe baza progreselor în tehnicile bioanalitice, medicina moleculară a dezvoltat metode eficiente pentru diagnosticul precoce al hemangiomului, care se bazează pe descoperirea de biomarkeri înainte de manifestarea simptomelor clinic.

După cum au arătat spectrele înregistrate, condițiile experimentale aplicate au permis screening-ul amestecului complex HE42 fără a pune în pericol ionizarea componentelor mici, care au semnificație biologică însemnată. Spectrul de masă generat prezintă un model de ioni moleculari foarte complex, cuprinzând specii caracterizate printr-o diversitate ridicată atât a lanțurilor de glicani, cât și a compozițiilor de fragmente de ceramidă, precum și câteva modificări relevante din punct de vedere biologic, cum ar fi atașamentele *O*-acetilarea, *O*-fucozilarea și  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ .

Astfel, proba analizată se caracterizează printr-o incidență crescută a glicoformelor GD3, spre deosebire de țesutul sănătos, analizat în studiile precedente, unde predomină speciile plosialilate, după cum se poate vedea graficul prezentat în Figura 3.3.



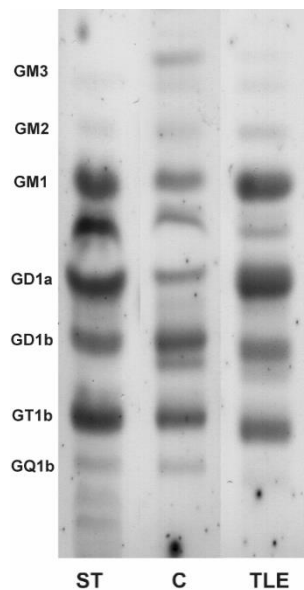


**Figura 3.3.** Grafic comparativ al speciilor gangliozidice din țesut sănătos vs țesut tumoral

Descoperirile prezente, inclusiv descoperirile legate de incidența crescută a gangliozidelor caracterizate de un grad scăzut de sialilare și un lanț zaharidic mai scurt, precum și detectarea pentru prima dată în hemangiomul cerebral a speciilor de asialo, adică GA1(d18:1/18:0), oferă un profil de gangliozide complet diferit și mai complex decât cel cunoscut până acum.

Modificări în compoziția sau metabolismul gangliozidelor cerebrale au fost găsite în diferite afecțiuni neurologice și neuropsihice și sunt considerate a fi implicate în procesele moleculare complexe și în patogeneza moleculară complexă a neurodegenerării. Dintre toate metodele, în ultimii ani, spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HR MS), realizată cu instrumente care încorporează analizatorul cu capcană orbitală, a apărut ca fiind una dintre cele mai puternice și mai reproductibile tehnici în fluxurile de lucru legate de științele omice țintite și nețintite.

Analiza calitativă a compoziției gangliozidelor cerebrale utilizând cromatografia pe strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) a arătat prezența tuturor fracțiunilor majore de gangliozide în proba de țesut hipocampal uman TLE în comparație cu proba de țesut hipocampal de control (C) (Figura 3.4.1).



**Figura 3.4.1.** Compoziția gangliozidelor cerebrale izolate din hipocampus afectat de epilepsie temporală (TLE) și de hipocampus de control (C) analizată cu ajutorul unui strat subțire de înaltă performanță cromatografie și comparată cu gangliozidele standard.

În acest studiu comparativ, rezoluția înaltă și măsurarea precisă a masei au permis discriminarea și atribuirea în proba de hipocampal TLE a nu mai puțin de 105 ioni corespunzând la 99 de specii de ganglioizide care diferă în compoziția nucleului lor glicanic și a fracțiunii lipidice și a 91 de ioni atribuiți la 75 de ganglioizide distincte în eșantionul de control.

Spre deosebire de eșantionul de control, hipocampul TLE a fost găsit mai îmbogățit în ganglioizide polisialilate, în special în tetrasialoganglioizide și fucoganglioizide. În total, din cele 99 de componente individuale identificate în TLE, s-a constatat că 87% conțin cel puțin două reziduuri Neu5Ac în structura lanțului oligozaharidic, cu o expresie în următoarea ordine crescătoare a numărului de structuri detectate: GT2 < GQ2 < GD2 < GD2 = GD3 < GT3 < GT1 < GD1 < GQ1.

Deoarece screening-ul HR MS a indicat că structurile din clasa GQ1 sunt puternic exprimate puternic în eșantionul TLE, acest extract de ganglioizidă domină numeric și poate fi o trăsătură moleculară caracteristică a TLE, în etapa finală a cercetării am efectuat o analiză structurală detaliată prin HCD MS/MS, utilizând  $[M-4H^+]^4$  detectat la  $m/z$  603,7844 ca ion precursor.

Rezoluția și precizia ridicată în determinarea maselor ionilor de fragment și condițiile optime de secvențiere prin HCD MS/MS au furnizat date fiabile privind structura intimă a structurii tetrasialilate GQ1(d18:1/18:0), o specie de ganglioizidă exprimată în mod specific în hipocampul TLE. Modalitatea de fragmentare a acestei specii a dovedit că este în concordanță cu izomerul GQ1b, o configurație care prezintă una dintre elementele disialo legate de galactoză interioară și unul de galactoză exterioară. De interes pentru comparație cu studiul nostru sunt datele care indică **o legătură a ganglioizidelor GD3 și GQ1b cu epilepsia temporală.**

#### ***Capitolul IV este destinat Concluziilor finale***

În **prima etapă a cercetării** am efectuat experimentele de spectrometrie de masă cu ionizare prin nanoESI QTOF MS, utilizând tehnica ionilor negativi pentru analizele diferitelor clase de ganglioizide standard pentru a determina valorile optime ale parametrilor, necesare în analizarea acestor categorii de molecule.

**A doua etapă de cercetare** s-a concentrat pe analiza prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție cu ajutorul nanoESI Orbitrap MS, pentru evaluarea ganglioizidelor extrase din țesut

cerebral sănătos și caracterizarea lor structurală prin utilizarea tehnicilor de fragmentare tandem MS. Astfel, un prim studiu efectuat pentru a determina compoziția și structura gangliozidelor la cerebelul fetal și adult a avut ca scop realizarea unei platforme de MS sigură și reproductibilă, care să permită observarea variațiilor din gangliozidomul cerebelului uman în timpul dezvoltării și îmbătrânirii creierului.

Prin compararea cerebelului fetal față de cel adult s-au constatat diferențe semnificative în ceea ce privește speciile de gangliozide exprimate, care pot fi atribuite procesului de neurodezvoltare și, prin urmare, ar putea fi utilizate ca markeri ai îmbătrânirii cerebelului.

**Mai multe specii de gangliozide au fost modificate de radicalii  $\text{CH}_3\text{COO}^\cdot$ .** Descoperirea lor aici indică faptul că structurile gangliozidice specifice activității colinergice sunt prezente și în țesutul cerebelos.

Cortexul motor uman a fost examinat pentru prima dată printr-o abordare de tipul HRMS, astfel văd în vedere caracteristica gangliozidelor de a forma cu ușurință anioni în soluție, injectarea probei prin nanoESI a fost optimizată în tehnica ionilor negativi și a fost urmată de analiza prin spectrometrie de masă pe un Orbitrap MS setat pentru detectarea analitului în modul HR.

Tot pentru prima dată în studiul de față s-a descoperit că regiunea cortexului motor din creierul uman este dominată de specii polisialilate.

**În cea de-a treia parte a cercetării,** a fost determinată compoziția și structura amestecului brut de gangliozide extras și purificat dintr-o tumoră benignă a creierului uman, și anume hemangiomul, utilizând spectrometria de masă Orbitrap cu rezoluție ultra-înaltă în tehnica ionilor negativi.

Platforma HR MS a permis discriminarea a nu mai puțin de **52 de specii diferite de gangliozide**, care au fost găsite asociate cu hemangiomul cavernos cerebral uman, un număr aproape dublu față de cel raportat vreodată în legătură cu această tumoră. **Apariția speciilor O-Ac-GM4(d18:1/16:0)**, precum și incidența ridicată a componentelor de tip GD2 în hemangiomul cavernos sunt în concordanță cu studiile anterioare, care asociază astfel de structuri cu gradul redus de malignitate al tumorii hemangiomului cerebral.

În ultimul studiu prezentat aici gangliozidomul hipocampusului afectat de epilepsia lobului temporal, a fost investigat pentru prima dată prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție în tandem într-o analiză comparativă cu un hipocampus normal.

Rezoluția și precizia ridicată în determinarea maselor ionilor de fragment și condițiile optime de secvențiere prin HCD MS/MS au furnizat date fiabile privind structura intimă a structurii tetrasialilate GQ1(d18:1/18:0), o specie de ganglioază exprimată în mod specific în hipocampul TLE.

