

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DISCIPLINA DE NEFROLOGIE

SIMULESCU E. ANCA



# TEZA DE DOCTORAT

IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA BIOMARKERILOR  
GLICOSFINGOLIPIDICI ÎN URINA PACIENȚILOR CU  
BOALĂ CRONICĂ DE RINICHI DIABETICĂ. STUDIU  
REALIZAT PRIN METODE GLICOMICE BAZATE PE  
SPECTROMETRIE DE MASĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ  
CU IONIZARE PRIN NANO ELECTROSPRAY.

## REZUMAT

Coordonator științific  
PROF. UNIV. DR. LIGIA PETRICA

Timișoara  
2023

## CUPRINS

Lista de lucrări publicate .....	VI
Listă de abrevieri .....	VII
Index figuri .....	X
Index tabele .....	XII
Mulțumiri .....	XIV
INTRODUCERE .....	XV
 PARTEA GENERALĂ .....	 1
1. BOALA CRONICĂ DE RINICHI ȘI BOALA RENALĂ DIABETICĂ. DEFINIȚIE, TERMINOLOGIE ȘI CONCEPT .....	1
1.1. Boala cronică de rinichi .....	1
1.2. Boala renală diabetică.....	2
1.2.1. Paradigma albuminuriei .....	3
1.2.2. Interacțiunea dintre glomerul și tubul proximal în boala renală diabetică .....	4
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII BIOMARKERILOR DIN BOALA RENALĂ DIABETICĂ.....	5
2.1. Biomarkeri ai bolii renale diabetice .....	5
2.1.1. Biomarkeri de afectare podocitară .....	7
2.1.2. Biomarkeri ai afectării membranei bazale glomerulare. ....	9
2.1.3. Biomarkeri ai deteriorării tubulilor proximali .....	10
2.1.4. Biomarkeri inflamatori .....	12
2.1.5. Biomarkeri de stres oxidativ .....	12
2.2. Analiza științelor omice în dezvoltarea de noi biomarkeri .....	13
2.2.1. Proteomică și peptidomică .....	13
2.2.2. Transcriptomică .....	14
2.2.3. Metabolomică .....	15
3. GANGLIOZIDELE CA BIOMARKERI .....	16
3.1. Definiția și structura ganglioazelor .....	16
3.2. Ganglioazele ca biomarkeri în afecțiunile renale .....	18
3.2.1. Boli renale ereditare .....	19
3.2.2. Glomerulonefritele primitive și secundare .....	20
3.2.3. Cancerul renal .....	24
3.3. Cartografierea ganglioazelor în creierul uman. Biomarkeri ai afecțiunilor cerebrale.....	25
3.3.1. Bolile neurodegenerative .....	26
3.3.2. Tumorile cerebrale .....	29

PARTEA SPECIALĂ .....	32
OBIECTIVE GENERALE .....	32
4. OPTIMIZAREA SPECTROMETRIEI DE MASĂ DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE PENTRU ANALIZA GANGLIOZIDELOR .....	35
4.1. Introducere .....	35
4.2. Obiectivele studiului .....	36
4.3. Materiale și metode .....	37
4.3.1. Colectarea probelor biologice .....	37
4.3.2. Etică .....	37
4.3.3. Extracția și purificarea ganglioizidelor .....	37
4.3.4. Spectrometrie de masă. Ionizarea prin nanoelectrospray .....	38
4.4. Rezultate și discuții .....	39
4.4.1. Screening-ul ganglioizidelor prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție .....	39
4.4.2. Identificarea structurilor di- și trisialilate prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție .....	46
4.5. Concluzii .....	49
5. EVALUAREA GANGLIOZIDELOR ÎN STADIUL PRECOCE DE BOALA RENALĂ DIABETICĂ, LA PACIENȚII CU DIABET ZAHARAT DE TIP 2, CU AJUTORUL SPECTROMETRIEI DE MASĂ ÎN TANDEM DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE .....	50
5.1. Introducere .....	50
5.2. Obiectivele studiului .....	51
5.3. Materiale și metode .....	52
5.3.1. Criteriile de includere a subiecților .....	52
5.3.2. Etică .....	52
5.3.3. Determinări de laborator .....	52
5.3.4. Pregătirea probelor .....	53
5.3.5. Spectrometria de masă cu ionizare prin nanoelectrospray .....	53
5.3.6. Analiza datelor .....	54
5.4. Rezultate și discuții .....	55
5.4.1. Screening-ul probelor prin NanoESI HR MS .....	55
5.4.2. Caracterizarea structurală prin HCD MS/MS a speciilor polisialilate la pacienții cu macroalbuminurie .....	62
5.5. Concluzii .....	68
5.6. Finanțare .....	69
6. EVALUAREA CRITICĂ A STADIULUI ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND ANALIZA GANGLIOZIDELOR PRIN TEHNICI DE SEPARARE ÎN FAZĂ LICHIDĂ, ÎN ASOCIERE CU SPECTROMETRIA DE MASĂ .....	70
6.1. Introducere și obiective .....	70
6.2. Materiale și metode .....	70

6.3. Rezultate și discuții .....	71
6.3.1. Gangliozele din lichidul cefalorahidian .....	71
6.3.2. Gangliozele din ser/plasmă .....	78
6.3.2.1. Gangliozele în serul pacienților cu neoplazii .....	79
6.3.2.2. Gangliozele în serul pacienților cu boala Parkinson .....	81
6.3.3. Gangliozele din laptele matern .....	81
6.4. Concluzii .....	89
6.5. Finanțare .....	90
CONCLUZII GENERALE .....	91
Contribuții originale .....	92
REFERINȚE .....	95

## INTRODUCERE

Diagnosticul precoce al bolii renale diabetice (BRD) este extrem de important, deoarece ar putea permite o intervenție promptă, prevenind astfel agravarea acestei afecțiuni, precum și riscul de a dezvolta boala renală în stadiul terminal. Prin urmare, o evaluare aprofundată a funcției renale și depistarea markerilor de disfuncție renală, printre care raportul albumină-creatinină urinară, nivelul creatininei serice și valoarea ratei de filtrare glomerulară, sunt considerate în prezent necesare pentru depistarea precoce a BRD. Având în vedere faptul că, până și stadiile incipiente ale BRD pot duce la creșterea morbidității și mortalității cardiovasculare, îmbunătățirea cunoștințelor legate de patogenеза acestei complicații microvasculare și dezvoltare unor intervenții terapeutice, sunt imperative.

Prin urmare, este posibil ca lipsa unor biomarkeri sensibili de diagnostic să fie cea mai importantă limitare în calea diagnosticării precoce a BRD. De-a lungul anilor, multe grupuri de cercetare au investigat biomarkerii serici, urinari și tisulari renali, cu scopul de a diagnostica BRD în stadiul precoce.

Glicosfingolipidele (GSL) reprezintă un grup de glicolipide, având în componență o porțiune lipidică hidrofobă (o bază sfingoidă sau o ceramidă), care este legată de cel puțin un reziduu oligozaharidic.

Dintre toate aceste glicosfingolipide, ganglioizidele (GGs) se bucură de un interes important. În prezent, investigarea structurală a GG reprezintă un pas esențial în descrierea arhitecturii complexe a tuturor speciilor, chiar și a celor mai puțin exprimate. Această caracteristică este atribuită avantajelor remarcabile oferite de spectrometria de masă (MS), care servește ca instrument analitic fundamental pentru examinarea acestor molecule.

**Obiectivele** prezentului studiu au fost acelea, de a aduce completări la cercetările anterioare, în ceea ce privește studierea afectării glomerulare și tubulare la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 (DZ de tip 2). Investigațiile actuale oferă perspective noi, prin identificarea unor noi potențiali biomarkeri de precocitate a bolii renale diabetice, care ar putea facilita dezvoltarea unor intervenții terapeutice inovatoare, cu potențial de a preveni sau încetini progresia acestei boli cronice.

**Obiectivele** studiilor experimentale se referă la:

- *Primul studiu* urmărește optimizarea și validarea metodei de spectrometrie de masă de înaltă rezoluție cu ionizare prin nanoelectrospray (nanoESI HR MS) pe un instrument Orbitrap, folosind probe de hemangiom cerebral. Obiectivul a constat în validarea diferitelor metode de pregătire a probelor, incluzând extracția, separarea, purificarea, identificarea și cuantificarea ganglioizidelor, precum și de a stabili condițiile optime de laborator pentru efectuarea acestor proceduri pe matrici biologice complexe, în vederea detectării structurilor biologice cu rol diagnostic și prognostic.
- *Al doilea studiu* a avut ca scop identificarea și caracterizarea ganglioizidelor din urina pacienților cu DZ tip 2, cu potențial rol de bioindicatori în diagnosticul precoce al BRD. Astfel, am utilizat platforma bioanalitică validată în primul studiu, care se referă la nanoESI HR MS pe un instrument Orbitrap, în modul ionilor negativi, atât pentru partea de screening, cât și pentru tehnica fragmentării tandem MS (MS/MS). S-au urmărit măsurarea, caracterizarea și analiza structurală detaliată a ganglioizidelor urinare la pacienții cu DZ de tip 2.

- *Cel de-al treilea studiu* reprezintă o evaluare critică a stadiului actual al cunoașterii, referitoare la tehnicile de analiză a gangliozidelor în diferite fluide corporale, utilizând tehnici moderne de cromatografie lichidă, cromatografie în strat subțire, cromatografie lichidă cu interacțiuni hidrofilă și separare prin mobilitate ionică, venite în completarea spectrometriei de masă.

**Cuvinte cheie:** boala renală diabetică; hemangiom cerebral; biomarkeri gangliozidici; glicomică; spectrometrie de masă de înaltă rezoluție în tandem; tehnici de separare

# PARTEA GENERALĂ

Partea generală a acestei teze este constituită din *trei capitole* și conține informații din literatura de specialitate, cu privire la definirea și patogenеза bolii cronice de rinichi (BCR), bolii renale diabetice (BRD), stadiul actual al descoperirii de biomarkeri pentru BRD, precum și la indentificarea gangliozidelor în mai multe patologii, de ex. afecțiuni renale, tumorile cerebrale, patologii neurodegenerative.

## 1. BOALA CRONICĂ DE RINICHI ȘI BOALA RENALĂ DIABETICĂ. DEFINIȚIE, TERMINOLOGIE ȘI CONCEPT

**Boala cronică de rinichi** este o afecțiune cronică, cu evoluție progresivă, caracterizată prin anomalii renale structurale și funcționale. Sunt importante depistarea și abordarea cauzei, care stă la baza bolii cronice de rinichi, pentru a reduce riscul de complicații ulterioare și pentru a întârzia progresia acestei afecțiuni. Diabetul, hipertensiunea arterială și glomerulonefrita se numără printre cele mai frecvente etiologii ale bolii cronice de rinichi.

Diabetul zaharat de tip 2 reprezintă una dintre principalele probleme de sănătate la nivel mondial. Efectele DZ de tip 2 cuprind, printre altele, și apariția complicațiilor microvasculare. Aproximativ 40% dintre pacienți vor dezvolta boala renală diabetică. Din ce în ce mai multe dovezi sugerează că diabetul este principala cauză a BCR și a stadiului terminal de BCR. Deoarece, chiar în stadiile incipiente ale **bolii renale diabetice**, există risc ridicat de mortalitate și morbiditate de cauză cardiovasculară, este esențială aprofundarea detaliată a patogenеза acestei complicații microvasculare, precum și abordarea unor strategii terapeutice.

**Albuminuria** a fost recunoscută în mod clasic ca fiind manifestarea clinică inițială în BRD, servind și ca marker biologic al progresiei bolii renale diabetice. În anumite situații, poate avea loc regresia albuminuriei, fie în mod spontan, fie ca urmare a instituirii tratamentului renoprotector. Mai mult, albuminuria a fost recunoscută ca fiind un factor de risc independent pentru bolile cardiovasculare. Cu toate acestea, studiile ulterioare au arătat că un procent ridicat de pacienți cu DZ de tip 2 ar putea rămâne în stadiul de normalbuminurie, în ciuda declinului de funcție renală. Prin urmare, tot mai multe date sugerează că teoria clasică asupra BRD, în care declinul ratei de filtrare glomerulară este precedat de valori ridicate ale albuminuriei, nu este neapărat corectă. Accentul s-a mutat pe tubul proximal (TP), care ar avea un rol esențial în fiziopatologia precoce a acestei complicații microvasculare renale. Evidențierea rolului PT în determinarea albuminuriei, a diminuat din importanța oferită inițial anomaliilor barierei glomerulare.

## 2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND DESCOPERIREA DE BIOMARKERI ÎN BOALA RENALĂ DIABETICĂ

În ultimii ani, au fost realizate progrese notabile în înțelegerea patogenеза BRD. Există o necesitate de a actualiza cunoștințele actuale, cu privire la modificările patologice, evoluția bolii și tratamentul pacienților cu BRD. Leziunile renală din cadrul diabetului zaharat

nu se petrec doar în compartimentul glomerular, ci și în compartimentul tubulo-interstițial și vascular.

Descoperirea de noi biomarkeri este imperios necesară.

S-a demonstrat că unii dintre acești biomarkeri pot prezice riscul de apariție a BRD. Până în prezent, se cunoaște că biomarkerii pot fi specifici pentru diferite componente ale nefronului: biomarkeri de afectare podocitară - nefrina, podocalixina; de la nivelul membranei bazale glomerulare - colagen, laminină; biomarkeri podocitari/endoteliali - factorul de creștere endotelială vasculară (VEGF); biomarkeri de afectare a tubulilor proximali - lipocalina asociată cu gelatinaza neutrofilă (NGAL), molecula de leziune renală-1 (KIM-1), N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidază (NAG), angiotensinogenul.

În ultimii câțiva ani, interesul s-a mutat către utilizarea abordărilor omice, cum ar fi proteomica, glicomica, metabolomica și transcriptomica, deoarece acestea au devenit o strategie ingenioasă în identificarea biomarkerilor.

### **3. GANGLIOZIDELE CA BIOMARKERI**

Ganglioizidele fac parte din clasa glicosfingolipidelor și cuprind o fracțiune hidrofobă (ceramida) și un lanț oligozaharidic hidrofil. Componenta hidrofobă constă dintr-o bază sfingoidă și un acid gras, ambele variind în structură de la o specie la alta. În plus, lungimea și compoziția părții hidrofile prezintă variabilitate. Ganglioizidele posedă caracteristici distinctive datorită prezenței uneia sau mai multor unități de acid sialic în lanțurile lor oligozaharidice. Ele constituie componente-cheie ale membranei plasmactice, unde se conectează la proteine, fosfolipide și colesterol pentru a forma rafturi lipidice.

#### **Ganglioizidele ca biomarkeri ai afecțiunilor renale**

Recent, glicosfingolipidele polare au fost intens studiate, datorită rolului lor ca potențiali biomarkeri în diagnosticarea precoce a unui număr de afecțiuni renale, ereditare sau neereditare, cum ar fi boala Fabry, glomerulonefrita idiopatică și secundară, boala polichistică renală și neoplasmul renal.

#### **Cartografierea ganglioizidelor din creierul uman. Biomarkeri ai afecțiunilor cerebrale**

Având în vedere faptul că creierul nu este ușor de studiat și că procesele patologice au avut deja loc înaintea apariției semnelor clinice, înțelegerea diferitelor tulburări neurologice a avansat semnificativ în ultimii ani. O cartografiere detaliată și o caracterizare structurală a glicosfingolipidelor acide este esențială, pentru a stabili rolul acestor componente în sistemul nervos central sănătos și bolnav. Bolile neurodegenerative severe pot fi cauzate fie de absența, fie de excesul de ganglioizide. O acumulare aberantă ar putea apărea, de asemenea, în unele boli neurodegenerative (boala Huntington, boala Alzheimer, boala Parkinson), în procesele de maturizare și îmbătrânire, precum și în tumorile cerebrale vasculare benigne și în tumorile maligne.



## PARTEA SPECIALĂ

În prezent, spectrometria de masă (MS) este considerată ca fiind una dintre cele mai eficiente, precise și sensibile tehnici de analiză a ganglioizidelor. MS poate fi utilizată pentru a obține informații valoroase privind compoziția și structura unor markerilor biochimici în probe biologice complexe. În astfel de cazuri, diverse metode de separare, cum ar fi electroforeza sau cromatografia, sunt utilizate în mod obișnuit înainte de evaluarea MS.

Această parte a lucrării conține trei studii clinice.

### 1. OPTIMIZAREA SPECTROMETRIEI DE MASĂ DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE PENTRU ANALIZA GANGLIOZIDELOR

Prezentul studiu s-a concentrat pe optimizarea și validarea tehnicilor de spectrometrie de masă de înaltă rezoluție, cuplată cu ionizarea prin nanoelectrospray, utilizând instrumentul cu capcană orbitală (Orbitrap) în modul ionilor negativi. Aceste metode au fost utilizate ulterior, cu scopul cartografierii și evaluării structurale a amestecurilor de ganglioizide obținute din hemangiomul cavernos uman, al unui pacient în vârstă de 42 de ani. Prin urmare, au fost puse în aplicare tehnici glicomice moderne.

Obiectivul, care a stat la baza optimizării acestei metode analitice, a fost acela de a evalua diferite clase de molecule, pentru a stabili condițiile optime de realizare a acestei proceduri, cât și pentru a valida diferite tehnici de pregătire a probelor, incluzând extracția, separarea, purificarea, identificarea și cuantificarea claselor și speciilor de ganglioizide.

Experimentele care au implicat MS au fost efectuate cu ajutorul unui spectrometru de masă LTQ Orbitrap Velos Pro™, care a fost echipat cu o sursă nanoES offline.

După efectuarea unei analize cuprinzătoare a spectrului și efectuarea unor calcule precise, cei 24 de ioni identificați, au fost atribuiți unor specii distincte de ganglioizide. Spectrele de masă obținute prezintă un model de ioni moleculari foarte complex, cuprinzând diverse specii, care se disting printr-o diversitate a lungimii lanțurilor oligozaharidice, dar și a lanțului de acizi grași. Totodată, se pot remarca mai multe modificări semnificative, cu potențial rol biologic, cum ar fi: *O-acetilarea* și *O-fucosilarea*.

Prin urmare, utilizarea HR MS are potențialul de a identifica numeroase specii necunoscute anterior. În plus, rezultatele actuale dezvăluie noi perspective, cum ar fi identificarea ganglioizidelor cu grad redus de sialilare și lanțuri glicanice mai scurte, precum și detectarea speciei asialo GA1 (d18:1/18:0) în hemangiomul cerebral. Prezența speciilor O-Ac-GM4 (d18:1/16:0) și prevalența componentelor de tip GD2 în hemangiomul cavernos ar putea reflecta gradul scăzut de malignizare a hemangiomului cerebral cavernos.

Mai mult, în urma analizei HR MS, s-a demonstrat faptul că amestecul de ganglioizide din acest tip de hemangiom cerebral a constatat în principal din specii cu lanțuri glicanice mai scurte și un număr redus de acizi sialici.

Pentru o inspecție mai atentă a acestor specii dominante, amestecul nativ de ganglioizide a fost supus unei separări prin cromatografie în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC). Separarea prin HPTLC și analiza individuală a fracțiunilor GD și GT a îmbunătățit detectarea componentelor minore, care, din cauza eterogenității ridicate a acestui amestec ganglioizidic, nu ar fi putut fi deosebite doar prin screening.

Aceste rezultate arată complexitatea ganglioizidomului asociat matricelor umane aberante, dar și faptul că, în studiul de față, am reușit o optimizare adecvată a condițiilor

nanoESI HR MS pentru detectarea și identificarea unor specii minore în amestecuri foarte complexe din extractele umane brute, dar cu valoare de biomarker. Speciile GD3(d18:1/16:0), GD2 (d18:0/13:0), GD3(d18:1/26:1) și O-Ac-GT1(d18:0/22:0) par a fi de interes major pentru diagnosticul precoce al hemangiomului carvenos.

## **2. EVALUAREA GANGLIOZIDELOR ÎN STADIUL PRECOCE DE BOALA RENALĂ DIABETICĂ, LA PACIENȚII CU DIABET ZAHARAT DE TIP 2, CU AJUTORUL SPECTROMETRIEI DE MASĂ ÎN TANDEM DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE**

Având în vedere lipsa de date disponibile până în prezent în domeniul glicolipidomicii, în ceea ce privește pacienții cu boală renală diabetică, studiul de față a abordat problematica detectării și caracterizării ganglioizidelor în urina pacienților cu DM de tip 2 cu BRD.

În acest scop, după optimizarea metodelor de spectrometrie de masă (MS) de înaltă rezoluție (HR) și MS în tandem (MS/MS), prin aplicarea parametrilor determinați în studiul anterior, am continuat cercetările noastre, prin implementarea acestor tehnici, pentru a identifica cu precizie prezența ganglioizidelor în urina pacienților cu BRD.

În cadrul unui studiu pilot, au fost evaluați pacienți cu DZ de tip 2 și subiecți marto. Am comparat ganglioizidomul a 30 de pacienți cu DZ de tip 2, repartizați pe 3 categorii, în funcție de raportul albumină/creatinină urinară (RAC): 10 pacienți normo- (RAC < 30 mg/g; numiți A1), 10 pacienți micro- (RAC 30-300 mg/g; numiți A2) și 10 pacienți macroalbuminurici (RAC > 300 mg/g; A3), cu cei a 10 subiecți de control sănătoși (C). LTQ Orbitrap Velos Pro este format dintr-o capcană ionică liniară și un analizor de masă Orbitrap, cu rezoluție și fiabilitate excelente, împreună cu o tehnică de fragmentare eficientă, reprezentată de disocierea indusă de coliziune (CID), pentru a obține o analiză completă a probelor complexe de urină. Toate spectrele de masă au fost achiziționate în condiții identice, în modul ionilor negativi.

Numărul și tipul de componente ganglioizidice evidențiate în probele A1, A3 și C au fost semnificativ diferite, în timp ce nu a existat nicio diferență între probele A1 și A2. Platforma MS performantă a permis detectarea și recunoașterea a 37 de specii diferite de ganglioizide și fuco-ganglioizide în cele trei probe. La efectuarea unei analize amănunțite a structurilor, s-a observat că lotul A3-macroalbuminuric a prezentat cel mai mare număr de compuși ganglioizidici unici, 19. După A3, proba C conținea 12 specii diferite de ganglioizide, în timp ce proba A1 cuprindea 10. Speciile detectate corespund la 15 clase distincte, care implică modificări ale componentei glicanice. Spre deosebire de probele A1 și C, A3 prezintă un număr mai mare de specii cu cel mai lung lanț O-glican asociat clasei G1, precum și o varietate mai mare de tipuri de ceramide. În plus, A3 prezintă un număr superior de clase de ganglioizide exprimate, respectiv 12, față de numai 6 în probele A1 și 6 în proba C. În plus, A3 conține un număr mai mare de GG, care prezintă modificări relevante din punct de vedere biologic, cum ar fi forme de tip O-acetil non-carbohidrat, O-fucosil carbohidrat și O-GalNAc.

În plus, având în vedere observația că au fost descoperite 7 trisialo GT1, 4 pentasialo GQ1 și 1 GS1 heptasialilat, gradul ridicat de sialilare ar putea servi ca o altă caracteristică specifică a lotului macroalbuminuric. În plus față de ganglioizidele di-, tri- și tetrasialilate din probele A1, ionul detectat la m/z 676,5569 a fost atribuit, conform calculului de masă, GP1(d18:1/18:0). Astfel de dovezi privind gradul de sialilare a probelor examinate

demonstrează precocitatea acestor modificări, chiar și în stadiul de normoalbuminurie. În mod clar, nivelul de sialilare crește pe măsură ce afecțiunea se agravează, ceea ce face ca acesta să fie un marker molecular care trebuie luat în considerare, nu doar pentru diagnosticarea precoce a BRD, ci și pentru o evaluare aprofundată a progresiei bolii și a eficacității terapeutice.

În urma unei analize amănunțite a componentei aglicone, s-a observat că ganglioizidele prezente în probele studiate prezintă, de asemenea, variații în compoziția părții lipidice, pe lângă diferențele notabile în structura lanțului glicanic. Din datele obținute, în probele A1 și A3 au fost detectate două specii care conțin baze sfingoide trihidroxilate ale acidului gras. S-a constatat că lotul A1 conține structuri de tipul GT1(t18:0/18:0) și GT1(t18:0/20:0), în timp ce lotul A3 a prezentat structuri complicate, cum ar fi GT1 trihidroxilat(t18:1/24:3) și Fuc-GT3(t18:1/18:3).

Utilizând MS/MS prin HCD, s-a constatat prezența unor ioni cu potențial predictibil pentru anumiți izomeri asociați cu poziționarea Neu5Ac în cadrul lanțului glicanic. Prezența izomerilor GQ1d(d18:1/18:0), GT1α(d18:1/18:0) și GT1b(d18:1/18:0) în lotul pacienților cu macroalbuminurie, a fost descoperită ca fiind asociată cu progresia BRD.

Majoritatea studiilor, care au ca scop caracterizarea ganglioizidomului urinar, utilizează în principal modele experimentale de nefropatie diabetică. Din cunoștințele noastre, acest studiu reprezintă punctul de plecare pentru investigațiile translaționale la subiecți umani, și documentează un profil special de ganglioizide urinare la persoanele diagnosticate cu DZ de tip 2. Studiul nostru evidențiază importanța gradului de sialilare a ganglioizidelor urinare și structura compozițională a ceramidelor, în diagnosticul precoce al BRD.

### **3. EVALUAREA CRITICĂ A STADIULUI ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND ANALIZA GANGLIOZIDELOR PRIN TEHNICI DE SEPARARE ÎN FAZĂ LICHIDĂ, ÎN ASOCIERE CU SPECTROMETRIA DE MASĂ**

După cum s-a demonstrat în cele două studii anterioare, spectrometria de masă este considerată ca fiind un instrument extrem de eficient pentru obținerea unei detalieri a structurilor complexe de glicani. MS, împreună cu MS în tandem (MS/MS), au capacitatea de a analiza acești compuși glicanici. Cu toate acestea, ele sunt insuficiente pentru o analiză amănunțită a structurilor glicanice izomere. Prin urmare, fragmentarea în stadii multiple (MS<sup>n</sup>) are capacitatea de a efectua o analiză aprofundată a acestor structuri. În cazul probelor biologice complexe (urină, sânge, lapte, LCR), este esențial să se separe mai întâi structurile glicanice, datorită necesității de a izola structuri individuale dintr-un amestec complex de glicani. Procesul de separare devine mai important în cazurile în care, structurile glicanice apar în cantități mici și necesită izolarea de alte structuri care sunt mai abundente. În plus, procesul de separare contribuie la îmbunătățirea performanțelor de ionizare, prin evitarea suprimării ionilor. Prin urmare, este adoptată pe scară largă cuplarea MS cu tehnici de separare în fază lichidă.

Spre deosebire de sistemul nervos central, ganglioizidele sunt prezente în fluidele corporale în cantități destul de reduse.

Prin urmare, cel de-al treilea studiu trece în revistă realizările semnificative ale tehnicilor moderne de separare, cuplate cu spectrometria de masă, în studiul ganglioizidelor prezente în fluidele corporale.

Abordările moderne, bazate pe tehnici de separare în fază lichidă cuplate la spectrometria de masă și caracterizate de o sensibilitate foarte ridicată, performanță de separare, rapiditate de analiză și precizie de identificare, sunt foarte eficiente și puternice pentru detectarea prezenței gangliozidelor în fluidele biologice. Cu toate acestea, utilizarea clinică, practică a acestor tehnici, în vederea identificării gangliozidelor ca markeri biochimici, este încă limitată.