

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA**

**FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**Departamentul IV Biochimie și Farmacologie**

**NOVACONI RAMONA CRISTINA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**UTILIZAREA SPECTROMETRIEI DE MASĂ ÎN ANALIZA ȘI  
CARACTERIZAREA GLICANILOR ȘI GLICOCONJUGATELOR CU  
SEMIFICAȚIE BIOLOGICĂ**

## **R E Z U M A T**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR., DEMA ALIS LILIANA CARMEN**

**Conducător de doctorat cotutelă:**

**PROF. UNIV. DR., ȘIȘU EUGEN**

**Timișoara**

**2024**

## REZUMAT

Teza de doctorat se circumscrie direcțiilor moderne de cercetare în biochimie, îmbinând într-un mod armonios preocupările pentru înțelegerea mecanismelor moleculare implicate în carcinogeneză cu utilizarea avansată a spectrometriei de masă pentru analiza și caracterizarea glicanilor și glicoconjugatelor cu semnificație biologică. Se valorifică astfel atât facilitățile oferite de tehnicile analitice de vârf, cât și resursele bioinformatic performante, contribuind la elucidarea rolului acestor biomolecule în procesele oncogenetice. Lucrarea este descrisă succint în cele ce urmează.

**Partea generală** cuprinde aspecte generale legate de:

1. Aspecte generale ale glicanilor și glicoconjugatelor
2. Caracteristici structurale, clasificare și nomenclatură a glicosfingolipidelor
3. Analiza prin spectrometrie de masă MALDI (ionizare asistată de laser cu desorbție în matrice) a glicosfingolipidelor

**Partea specială**, care cuprinde contribuțiile originale ale demersului experimental, fiind alcătuită din două capitole mari:

4. Analiza profilului glicolipidic în tumori cerebrale secundare (introducere, materiale și metode, rezultate, discuții și concluzii)
5. Analiza glicanilor modificați la capătul reducător în vederea obținerii de glicoconjugate prin tehnici moderne ale spectrometriei de masă (introducere, parte experimentală, rezultate și concluzii)

**Partea generală** începe cu prezentarea unor elemente generale despre glicani, o clasă diversificată de biomolecule formate din lanțuri de zaharide, componente esențiale ale glicoproteinelor și glicolipidelor, având un rol crucial în numeroase procese biologice datorită secvenței monozaharidelor și legăturilor glicozidice specifice, precum și despre glicosfingolipide (GSL), un subtip de glicolipide, sunt integrate în membrana plasmatică și implicate în funcții biologice esențiale, (adeziunea celulară și semnalizarea celulară). Fiecare componentă a GSL joacă un rol specific în procese biologice complexe, influențând recunoașterea moleculară, diferențierea celulară și apoptoza. Modificările în structura sau expresia GSL sunt asociate cu diverse afecțiuni patologice, inclusiv boli neurodegenerative, cancer și boli autoimune.

Spectrometria de masă (MS) a devenit un instrument esențial pentru elucidarea structurii și profilurilor GSL, deși analiza acestor molecule complexe rămâne provocatoare. Metode avansate, precum MALDI-MS, oferă avantaje semnificative în investigarea GSL, contribuind la înțelegerea lor în contextul sănătății și bolii.

În partea generală se detaliază din literatura de specialitate sistemul de clasificare a GSL-urilor, nomenclatura specifică care se adoptă, precum și caracteristicile lor structurale, apoi se detaliază din literatură studiile efectuate până în prezent prin MALDI – non-imaging a GSL-urilor (se prezintă harta de fragmentare a GSL-urilor, influența diferitelor matrici utilizate pentru spectrometria MALDI asupra rezultatelor obținute, rezultatele studiilor efectuate până în prezent prin spectrometrie de masă MALDI din țesuturi umane sănătoase și patologice).

**Partea specială**, cuprinde două capitole, primul dedicat

## 1. Analizei profilului glicolipidic în tumori cerebrale secundare.

**Introducere:** Cancerul cerebral metastatic apare atunci când un neoplasm se extinde la creier din alte părți ale corpului, fiind mult mai frecvent decât neoplasmele cerebrale primare. Riscul de metastază cerebrală variază în funcție de tipul și gradul tumorii primare, cele mai frecvente surse fiind cancerul pulmonar, de sân, colon, rinichi și piele. În special, cancerul pulmonar este recunoscut pentru agresivitatea sa și pentru capacitatea de a metastaza devreme la creier, fiind asociat cu un prognostic grav.

Glicosfingolipidele (GSL), un subtip de sfingolipide, sunt omniprezente în membranele celulare și joacă un rol esențial în adeziunea celulară și transducția semnalelor, fiind implicate în diverse tipuri de cancer, inclusiv cancerul pulmonar și neoplasmele cerebrale. Modificările în expresia și structurarea GSL sunt asociate cu progresia tumorii și dezvoltarea rezistenței la chimioterapie. Aceste modificări implică alterări în glicozilarea suprafeței celulare, ceea ce influențează recunoașterea celulară și transducția semnalelor.

În ultimele decenii, spectrometria de masă (MS) a devenit un instrument crucial pentru analiza structurii glicoconjugatelor, inclusiv a GSL. Metode avansate, cum ar fi MALDI-MS, permit caracterizarea detaliată a GSL, oferind informații esențiale despre masele moleculare, secvența și ramificațiile acestora. Lucrarea de față prezintă profilul GSL obținut prin MALDI-TOF MS dintr-o tumoră cerebrală metastatică de origine pulmonară, contribuind la înțelegerea mecanismelor de dezvoltare a cancerului și la dezvoltarea de terapii țintite.

**Materiale și metode** În acest studiu, am investigat un eșantion de tumoră cerebrală secundară provenind de la un pacient de sex masculin, în vârstă de 66 de ani, diagnosticat cu un adenocarcinom pulmonar slab diferențiat (cancer pulmonar fără celule mici, NSCLC). Eșantionul de tumoră, cu o masă de 0,63 g, a fost obținut în urma unei rezecții chirurgicale și a fost ulterior supus unui proces complex de extracție și purificare pentru a izola glicolipidele sfingozidice (GSL), compuși de interes pentru acest studiu.

În prima etapă, eșantionul a fost cântărit cu precizie și omogenizat într-un blender în prezența gheții pentru a menține o temperatură scăzută, obținând astfel un omogenizat cu un conținut de aproximativ 10% substanță uscată. Omogenizatul a fost apoi supus unei extracții în două etape folosind un amestec de solvenți ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 1 : 2 : 0,75 volumic) la o temperatură sub  $5^\circ\text{C}$ , pentru a extrage componentele lipidice. Faza superioară, care conținea GSL polare, a fost separată de faza inferioară prin adăugarea de metanol și apă într-un raport volumic de 1:1:1, urmată de o etapă de uscare a supernatantului utilizând un evaporator rotativ (Speedvac SPD121P ThermoScientific).

Pentru a purifica amestecul brut de GSL, eșantionul uscat a fost filtrat prin gel Sephadex G-25 și monitorizat prin cromatografie în strat subțire (TLC) pentru a identifica fracția de interes. Tuburile conținând fracția relevantă au fost combinate, iar solventul a fost eliminat prin antrenare cu azot ( $\text{N}_2$ ), urmată de o uscare finală într-un exsicator peste  $\text{P}_2\text{O}_5$ , obținând un amestec brut de GSL cu o masă finală de 4,31 mg.

Pregătirea pentru analiza prin spectrometrie de masă (MALDI-TOF MS) a inclus dizolvarea acestui amestec brut în 2 ml de metanol cu o puritate de 99,8%, urmată de vortexare și centrifugare la 2000 rpm timp de 20 de minute, pentru a sedimenta impuritățile. Pentru a optimiza ionizarea și a obține un semnal de calitate în timpul analizei, au fost realizate diluții multiple ale soluției stoc, identificându-se că diluția 1:700 oferă spectrul de cea mai bună calitate. Astfel, concentrația finală a soluției metanolice de GSL analizată prin MS a fost stabilită la  $2,45 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ .

Spectrele de masă au fost obținute folosind un spectrometru de tip Bruker Ultraflextreme MALDI-TOF, operând în modul negativ și echipat cu un laser Smartbeam II de 355 nm. Parametrii de operare au inclus o frecvență a laserului de 2000 Hz, o tensiune a acceleratorului de 20,07 kV și o extracție întârziată de 250 msec. Fiecare spectru a fost rezultatul acumulării a 1000 de impulsuri laser, iar cel puțin 10 spectre individuale au fost combinate pentru a obține un spectru final robust. Calibrarea spectrelor a fost realizată extern folosind un amestec standard de ganglioze (sare de amoniu, creier de bovin), iar procesarea datelor a fost efectuată cu ajutorul software-ului FlexAnalysis, versiunea 3.3.

Eșantioanele de GSL au fost aplicate pe suporturi metalice șlefuite (MTP 384, Bruker Daltonics) și acoperite cu o matrice de acid 2,5-dihidroxibenzoic (2,5-DHB), preparată prin dizolvarea acesteia într-un amestec de apă/metanol/acetone (6:1:3 volumic). Solubilizarea optimă a matricei a fost obținută cu sau fără adăugarea de acid formic ( $\text{HCOOH}$ ) sau acid trifluoroacetic (TFA) la o concentrație de 0,1%.

Prin intermediul acestor metode riguroase, am reușit să obținem și să caracterizăm detaliat profilul GSL din eșantionul de tumoră cerebrală metastatică, oferind astfel informații valoroase pentru înțelegerea mecanismelor moleculare implicate în cancer și posibilele ținte terapeutice.

**Rezultate.** Rezultatele studiului au evidențiat optimizarea separării glicolipidelor sfingozidice (GSL) prin cromatografie în strat subțire (TLC). Au fost testate diverse faze staționare și amestecuri de solvenți pentru a identifica condițiile optime de separare, rezultatul cel mai bun fiind obținut cu sistemul de eluție metanol: cloroform: apă (40:50:10). Vizualizarea fracțiunilor a fost realizată folosind un reactiv pe bază de molibdat de amoniu și sulfat de ceriu.

Analiza prin spectrometrie de masă (MALDI-TOF MS) a amestecurilor de lipide din țesutul tumoral cerebral a fost optimizată folosind o matrice 2,5-DHB fără adăugarea de acid formic sau acid trifluoroacetic, obținându-se cele mai bune spectre la o concentrație de 20 mg/mL. Spectrele  $\text{MS}^1$  au evidențiat prezența mai multor specii de sfingolipide și glicolipide complexe, cu precădere ceramide, hexozilceramide și ganglioze.

În cadrul studiului, analiza spectrometrică a amestecurilor de glicolipide sfingoizidice (GSL) izolate din țesutul tumoral cerebral metastatic a relevat o serie de structuri ionice complexe, fiecare având implicații importante în înțelegerea mecanismelor moleculare ale tumorii. Printre structurile ionice de interes descoperite se numără ceramidele simple, glicolipidele complexe, precum și ganglioizidele, toate având roluri biologice semnificative.

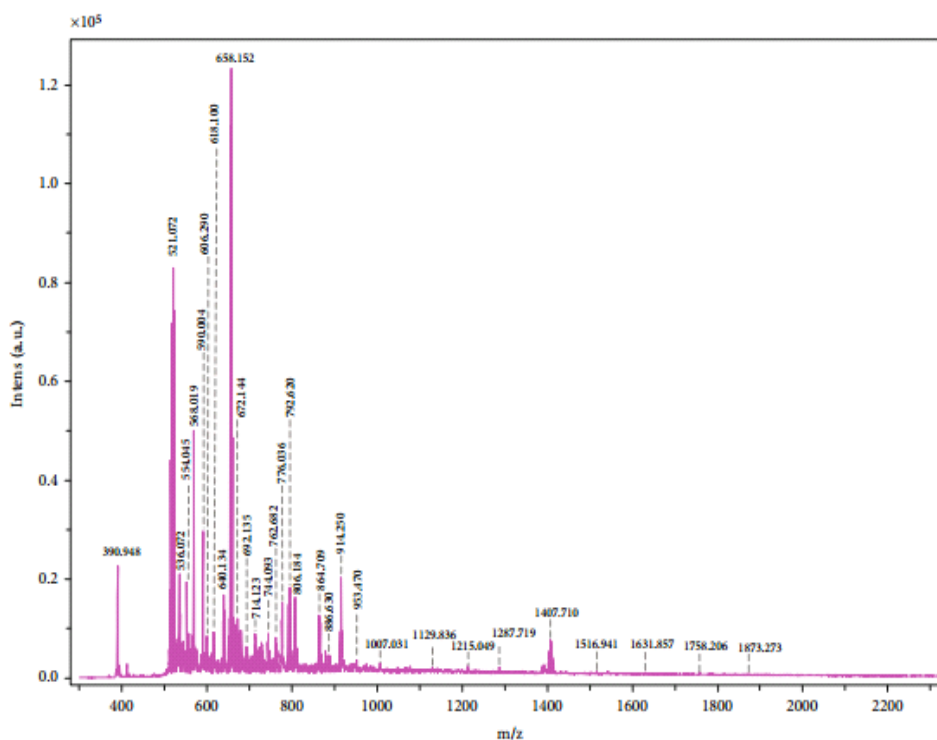


Figura 2: MALDI QTOF MS<sup>1</sup> a amestecului nativ de ganglioizide izolat din tumoarea cerebrală secundară. Sursa de ionizare 1: 25,00 kV; sursa de ionizare 2: 21,30 kV; lentilă: 10,50 kV; reflector: 26,30 kV; reflector 2: 13,85 kV, extracție pulsată a ionilor: 50 ns. Matrice: 2,5-DHB. Solvent: MeOH.

Structurile identificate sunt după cum urmează:

#### a) Ceramidele simple (Cer)

Ceramidele simple sunt molecule de bază în biosinteza sfingolipidelor și au fost identificate în spectrele de masă la diferite valori de  $m/z$ , incluzând:

- **$m/z$  521.072:** Acest ion corespunde unei ceramide cu baza sfingoide (SPB) d18:1 și un acid gras (FA) cu 15 atomi de carbon, sugerând o structură de tip Cer 33:1; O<sub>2</sub>.
- **$m/z$  536.072:** Atribuită unei ceramide cu SPB d18:1 și FA C16:0 sau d20:1/14:0, indicând o structură de Cer 34:1; O<sub>2</sub>.
- **$m/z$  618.100:** Aceasta corespunde unei ceramide fosforilate (CerP), cu baza sfingoide d18:0 și FA C16:0, indicând prezența unui ion [M-H]<sup>+</sup> - care sugerează o structură de tip CerP 34:0; O<sub>2</sub>.

Aceste ceramide au fost implicate în diverse procese celulare, cum ar fi apoptoza și proliferarea celulară. De exemplu, ceramidele fosforilate (de tip CerP) sunt cunoscute pentru rolul lor în inhibarea apoptozei prin blocarea sfingomielinazei acide și activarea căii PI3K/AKT, o cale esențială în supraviețuirea celulară.

#### **b) Hexozilceramide (Hex-Cer)**

Hexozilceramidele sunt glicolipide simple în care o moleculă de zahăr este atașată la ceramidă. În acest studiu, au fost identificate mai multe Hex-Cer:

- **m/z 792.620:** Acest ion a fost atribuit unei Hex-Cer cu baza sfingoide d18:1 și un acid gras cu 20 de atomi de carbon, indicând o structură de Hex-Cer(d18:1/20:0).
- **m/z 766.078:** Atribuită unei sulfatide, un tip de Hex-Cer modificat cu o grupare sulfat, sugerând o structură de tip HSO<sub>3</sub>-3Galβ-Cer(d18:1/h14:0).

Hexozilceramidele joacă roluri cruciale în structura membranelor celulare și în procesele de recunoaștere celulară. În mod particular, sulfatidele sunt implicate în interacțiuni celulare importante și au fost asociate cu procese patologice, inclusiv cancerul.

#### **c) Ganglioizidele**

Ganglioizidele sunt glicolipide complexe care conțin unul sau mai mulți reziduuri de acid sialic. În acest studiu, diverse ganglioizide au fost identificate, inclusiv:

- **m/z 1407.710:** Acest ion corespunde unei structuri de ganglioizidă complexă de tip KDN-GM1, care conține un rest rar de acid deaminoneuraminic (KDN) legat la baza sfingoide t16:1 și un acid gras cu 12 atomi de carbon. Aceste structuri sunt neobișnuite și pot indica procese oncogenice specifice sau particularități ale metabolismului glicolipidic în celulele tumorale.
- **m/z 1467.243:** Atribuită unei ganglioizide GM2, aceasta conține SPB d18:1 și FA C24:0, o structură comună în ganglioizidele asociate tumorilor.
- **m/z 1759.163:** Acest ion sugerează prezența unei structuri de disialyl Lea, o ganglioizidă asociată cu antigene tumorale, indicând posibile implicații în procesele de recunoaștere celulară și metastazare.

Ganglioizidele identificate sunt implicate în semnalizarea celulară, adeziunea intercelulară și sunt adesea supraexprimate în celulele tumorale, contribuind la invazia și metastazarea cancerului. De asemenea, prezența unor ganglioizide rare precum cele conținând KDN indică o posibilă modificare a căilor metabolice în contextul tumoral, ceea ce ar putea deschide noi perspective pentru cercetarea biomarkerilor și a terapiilor țintite.

#### **d) Specii fosforilate și glicozilate complexe**

În spectrele de masă au fost identificate și alte specii complexe, cum ar fi:

- **m/z 728.120:** Atribuită sfingomielinei (SM), o sfingolipidă fosforilată importantă în menținerea integrității structurale a membranelor celulare și în semnalizarea celulară.
- **m/z 2286.826:** Atribuită unui antigen de tip Lewis (sLea-x) legat de o ceramidă, ceea ce sugerează implicarea acestui GSL în procesele de metastazare, dat fiind faptul că antigenele Lewis sunt markeri bine-cunoscuți în procesele de aderență celulară și migrare.

Identificarea acestor structuri ionice complexe și analiza lor detaliată prin spectrometrie de masă a oferit o imagine comprehensivă asupra compoziției lipidice a țesutului cerebral metastatic. Profilul identificat, dominat de glicolipide complexe, sugerează modificări specifice asociate cu procesele oncogenice, incluzând adaptări în sinteza și modificarea glicolipidelor care pot influența comportamentul celular, invazia tumorală și interacțiunile celulare.

Aceste descoperiri subliniază importanța continuării cercetărilor asupra glicolipidelor și sfingolipidelor în cancer, atât pentru înțelegerea mecanismelor moleculare implicate în tumorigeneză, cât și pentru dezvoltarea de noi terapii țintite care să vizeze aceste molecule critice.

**Discuții.** Discuțiile din acest studiu subliniază complexitatea compoziției lipidice în celulele tumorale, evidențiind diferențele semnificative față de celulele normale și variabilitatea între diferitele tipuri de tumori. Un aspect central este reprogramarea metabolică a celulelor canceroase, care determină modificări în lungimea și gradul de nesaturare al acizilor grași (FA), influențând astfel proprietățile membranei celulare, cum ar fi fluiditatea și stabilitatea domeniilor lipidice ("rafturi lipidice"). Aceste modificări sunt asociate cu procese esențiale pentru tumorigeneză și metastază, inclusiv semnalizarea celulară și rezistența la chimioterapie.

Un punct important al discuției este concentrația crescută de cerebrozide în membrana plasmatică a celulelor tumorale, care poate funcționa ca un semnal metastatic și antiapoptotic, contribuind la rezistența la tratamentele chimioterapeutice. De asemenea, reglarea pozitivă a sintezei GlcCer și acumularea acestor glicolipide pot neutraliza semnalele proapoptotice, favorizând un fenotip de rezistență multimedicamenteasă.

Glicozilarea aberantă, în special sialilarea modificată a glicolipidelor, este discutată ca un marker distinctiv al malignității. Modificările în conținutul și expunerea acidului sialic pe suprafața celulelor tumorale sunt asociate cu metastazarea, iar antigenele Lewis sialilate, cum ar fi sLeA și sLeX, joacă un rol crucial în adeziunea celulelor canceroase la endoteliul vascular, facilitând metastaza. Expresia crescută a acestor antigene este asociată cu un prognostic nefavorabil în diverse tipuri de cancer.

Discuția abordează și expresia anormală a acizilor sialici rari, cum ar fi acidul deamino-neuraminic (KDN) și N-glicolilneuraminic (Neu5Gc), în celulele tumorale. Aceste modificări sunt legate de supraviețuirea mai redusă a pacienților cu NSCLC și de potențialul acestor compuși ca markeri prognostici negativi. S-a observat că Neu5Gc este integrat din surse alimentare în glicocalixul celular, iar prezența sa este corelată cu o evoluție nefavorabilă a bolii.

În concluzie, studiul subliniază importanța profilării glicolipidelor, în special a celor sialilate, în înțelegerea proceselor de metastază cerebrală și sugerează că glicolipidele pot servi drept ținte diagnostice și terapeutice în cancer. Totuși, sunt necesare cercetări suplimentare pe un eșantion mai mare pentru a valida aceste descoperiri și a explora pe deplin rolul glicosfingolipidelor în tumorigeneză și metastază.

Al doilea capitol al părții speciale este adresat:

## **2. Analizei glicanilor modificați la capătul reducător în vederea obținerii de glicoconjugate prin tehnici moderne ale spectrometriei de masă**

**Introducere.** Polizaharidele, sau glicanii, pot fi modificați chimic la nivelul grupărilor hidroxilice primare și secundare, cu un accent deosebit pe reactivitatea capătului reducător al acestora. Această reactivitate este exploatată pentru a obține materiale biocompatibile utilizate în medicină. Studiile privind modificarea capătului reducător al glicanilor la scară preparativă sunt relativ limitate, iar caracterizarea acestor produse prin spectrometrie de masă a fost insuficient ilustrată.

În acest context, metodele analitice moderne, cum ar fi spectrometria de masă MALDI-TOF și ESI-MS, au fost utilizate pentru a analiza glicanii modificați și derivații lor. De exemplu, derivatizarea glicanților cu 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonat (ANTS) prin aminare reductivă și analiza lor ulterioară prin electroforeză capilară (CE) și ESI-MS au permis detectarea oligozaharidelor până la un grad de polimerizare de 13. Totodată, tehnicile MALDI-TOF au fost folosite pentru caracterizarea glicolipidelor complexe și a polizaharidelor, demonstrând îmbunătățiri semnificative ale semnalului prin derivatizare chimică.

Alte studii au raportat derivatizarea zaharidelor prin diverse metode, cum ar fi utilizarea esterului etilic al 2-(dietilamino) acidului 4-aminobenzoic sau formarea derivaților benzimidazolici, care îmbunătățesc sensibilitatea și acuratețea analizelor prin spectrometrie de masă. Aceste metode au fost aplicate cu succes pentru analiza maltooligozaharidelor și a glicolipidelor din surse naturale, cum ar fi glucanul din *Ganoderma lucidum*.

În concluzie, derivatizarea capătului reducător al polizaharidelor și utilizarea spectrometriei de masă pentru analiza și caracterizarea acestora reprezintă tehnici avansate și eficiente, care pot contribui semnificativ la dezvoltarea materialelor biocompatibile și la înțelegerea structurii glicanilor și glicoconjugatelor.

**Partea experimentală** Partea experimentală a acestui studiu se concentrează pe funcționalizarea unei maltodextrine cu masă moleculară medie (Paselli 6, Mw=2800) printr-o reacție de aminare reductivă folosind 4,4'-diamina difenilmetan (DADFM). Obiectivul acestei secțiuni a fost de a sintetiza un derivat macromolecular care să păstreze caracteristicile funcționale ale componentelor inițiale și să fie adecvat pentru aplicabilități ulterioare.

**Reactivi și materiale.** Toți reactivii utilizați au fost de calitate analitică, fiind achiziționați de la furnizori de încredere. Maltodextrina Paselli 6 a fost utilizată ca substrat principal, iar DADFM a servit drept agent de aminare. Solvenții precum dimetilformamida (DMF) și dimetilsulfoxidul (DMSO) au fost testați pentru a asigura solubilitatea adecvată a reactanților și compatibilitatea acestora în timpul reacției.

**Aparatura.** Pentru realizarea experimentelor, s-au utilizat diverse echipamente de laborator, incluzând o centrifugă XC 2145 pentru separarea fazelor reacției și un spectrofotometru UV-VIS Biochrom Libra S12 pentru analiza spectroscopică. Spectrometria de masă a fost realizată utilizând un spectrometru de masă LTQ Orbitrap Velos Pro™, care a permis obținerea de date precise despre masa moleculară și structura ionilor de fragmentare, esențiale pentru caracterizarea produsului final.

**Procedura de sinteză.** Funcționalizarea maltodextrinei s-a realizat printr-o reacție de aminare reductivă, care a implicat următoarele etape:

**Pregătirea amestecului de reacție:** Într-un balon de 25 ml echipat cu refrigerent ascendent și agitator magnetic, s-au introdus 1,25 g de maltodextrină Paselli 6 și 1,24 g de



DADFM fin măcinat, dizolvate în 4 ml de apă. Amestecul a fost agitat la temperatura camerei, iar pH-ul a fost ajustat la 4 prin adăugarea de acid acetic glacial.

**Reacția de aminare reductivă:** Temperatura amestecului a fost ridicată treptat la 55°C, moment în care soluția a devenit limpede. S-a început adăugarea treptată a cianoborohidruirii de sodiu ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) pe parcursul a cinci zile, menținând temperatura la 55°C. Pe timpul nopții, reacția a fost lăsată fără încălzire, dar cu agitare continuă. După finalizarea adăugării agentului reducător, reacția a fost considerată completă, pH-ul final fiind între 5,5 și 6,5.

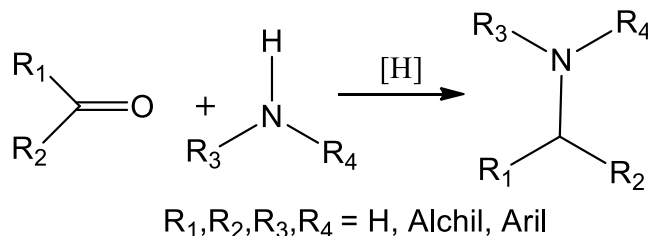


Figura 3 Reacția de aminare reductivă

**Purificarea produsului:** După terminarea reacției, s-au adăugat 15 ml de apă rece pentru a stopa reacția. Amestecul a fost apoi transferat într-un pahar Berzelius, unde a fost tratat cu alcool etilic absolut pentru a precipita produsul. Precipitatul rezultat a fost filtrat sub vid și suspendat în acetonă timp de 24 de ore pentru a elimina impuritățile.

**Controlul calității:** Produsul obținut a fost testat pentru prezența DADFM nereacționat folosind cromatografie în strat subțire (CSS) pe plăci de silicagel, utilizând un solvent compus din AcOEt în raport 1:2. Dacă DADFM era prezent, produsul era resuspendat în acetonă și procesul de purificare era repetat.

**Separarea produsului final:** Produsul purificat, care conținea atât polizaharidă funcționalizată cât și polizaharidă nereacționată, a fost supus unui proces de separare pentru a izola dextranul funcționalizat. Acesta a fost dizolvat în apă și trecut printr-o coloană de schimb de cationi (Amberlite IR-120), utilizând apă dublu deionizată și soluție de amoniac pentru a elua produsul dorit.

**Liofilizarea și conservarea:** După dializă, soluția a fost liofilizată pentru a obține un praf de culoare bej deschis, care a fost conservat în exicator peste  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Acest produs final reprezintă un compus macromolecular polidispers, ce prezintă caracteristicile specifice ale componentelor utilizate în reacție.

**Analiza produsului final.** Pentru a verifica succesul reacției de aminare reductivă, produsul a fost supus unei inspecții UV comparativă cu reactanții inițiali. Spectrele UV-VIS au fost înregistrate și comparate pentru a identifica modificările semnificative în absorbția caracteristică, confirmând astfel funcționalizarea polizaharidei. Spectrometria de masă LTQ Orbitrap a fost utilizată pentru a analiza structura moleculară a produsului, oferind informații detaliate despre masele moleculare și secvențele fragmentelor rezultate.

**Concluzii experimentale.** Această procedură experimentală detaliată a demonstrat complexitatea procesului de funcționalizare a polizaharidelor cu mase moleculare medii și mari. Succesul reacției depinde în mare măsură de optimizarea condițiilor de reacție, inclusiv alegerea solvenților adecvați, controlul temperaturii și monitorizarea atentă a reacției. Produsele obținute au fost caracterizate printr-o combinație de tehnici avansate de spectroscopie și spectrometrie de masă, oferind o înțelegere aprofundată a structurii și proprietăților acestor

compuși. Aceste rezultate sunt promițătoare pentru aplicarea derivatelor polizaharidice în diverse domenii, inclusiv medicină și biotehnologie.

**Rezultate și discuții.** Atașarea componentelor glucidice la produșii naturali este un proces biochimic esențial, care, în cazul proteinelor, se manifestă ca un eveniment co- și post-translațional, catalizat de transferaze. Alte tipuri de conjugări, cum ar fi cele cu lipide sau terpene, sunt de asemenea posibile, rezultând bioconjugări cu funcții și roluri celulare unice. Atașarea necatalizată de componente zaharice este cunoscută sub numele de glicanare. Deși în literatură acest proces este adesea descris ca glicozilare, termenul este uneori inexact, deoarece nu implică întotdeauna atașarea unui rest glicozil propriu-zis.

Un mod obișnuit de a realiza această modificare este aminarea reductivă, o reacție în care o aldehydă sau cetonă condensează cu o amină în prezența unui agent reducător. Importanța acestei reacții este evidențiată de numeroasele aplicații în sinteza organică, conjugarea biomoleculelor și obținerea de nanoparticule. Agenții reducători folosiți în aminarea reductivă includ cianoborohidru de sodiu sau litiu, borohidru de sodiu, triacetoxiborohidru de sodiu și alți compuși din clasa boranilor.

În experimentul nostru, am obținut cu succes maltodextrina funcționalizată cu DADFM prin aminare reductivă, după ce am testat o serie de rețete și proceduri de sinteză pentru a maximiza randamentul. Am demonstrat legarea agliconului la maltodextrină folosind analiza termogravimetrică (TG, DTG, DTA), iar rezultatele au indicat diferențe semnificative între produsul reacției și amestecul fizic al reactanților.

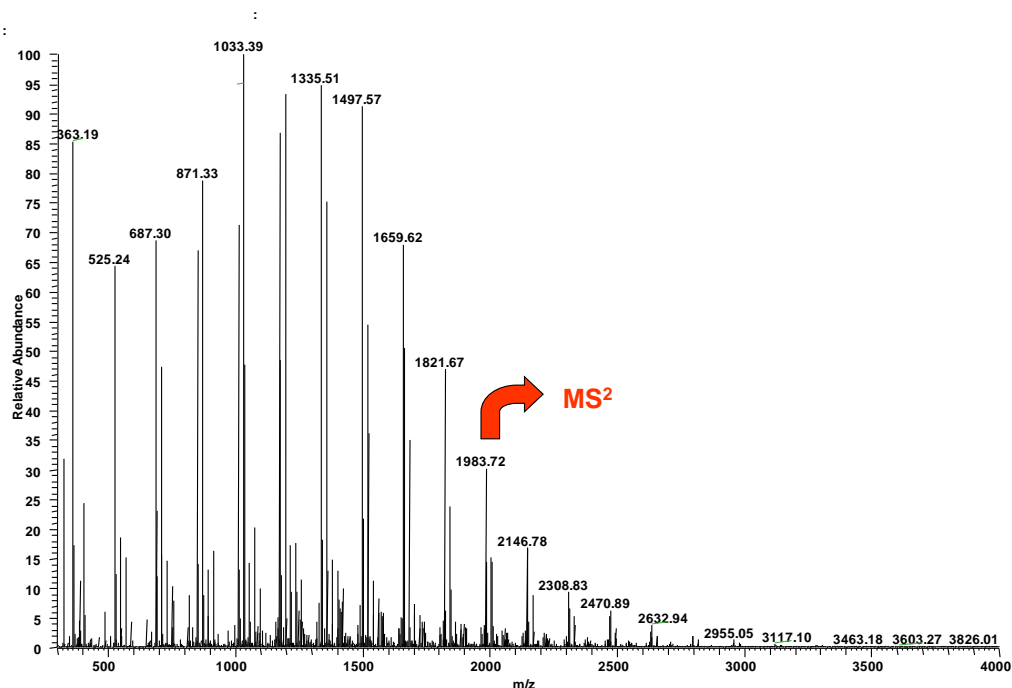


Figura 5. Analiza maltodextrinei ( $M_w=2800$  Da) funcționalizată cu DADFM (PARA) prin (+) NanoESI Orbitrap MS; Solvent: MeOH. Concentrația probei:  $1\text{ ng}/1\mu\text{L}$ ; Tensiunea pe sursă  $0.9\text{ kV}$ ; temperatura pe capilar  $250^\circ\text{C}$ .

Ulterior, am analizat produsul reacției prin spectrometrie de masă folosind un spectrometru LTQ Orbitrap Velos Pro™, obținând spectre detaliate ( $\text{MS}^1$ ,  $\text{MS}^2$  și  $\text{MS}^3$ ) care au permis secvențializarea și identificarea fragmentelor rezultate din reacție. Aceste analize au confirmat legarea cu succes a agliconului la maltodextrină, fără a observa fragmentări de inel, ceea ce subliniază succesul procesului de aminare reductivă.

**Concluzii:** analizând rezultatele obținute se pot desprinde următoarele concluzii:

- Cea mai semnificativă majoritate a ionilor analizați este cea a speciilor dublu încărcate (~60%). În cazul acesta cele care predomină sunt speciile disodiate, dipotasiate, monosodiate-monopotasiate sau monosodiate-monoprotonate sau monopotasiate monoprotonate.
- Cea de-a doua specie semnificativă este cea a ionilor simplu încărcăți (~18%). Speciile cele mai frecvente sunt cele monoprotonate, monosodiate. Restul, mai puțin de 12% este reprezentată de ioni triplu încărcăți.
- Spre deosebire de analiza chip-(+)-ESI-QTOF cu infuzie prin robotul nanoMATE, sau MALDI-TOF-MAS, care favorizează speciile multiplu încărcate, introducerea prin nanoFLEX favorizează speciile ionice mono și dublu încărcate.
- Pe lângă speciile ce conțin agliconul se pun în evidență (~40%) specii ionice corespunzătoare detașării fragmentelor oligozaharidice de la capătul nereducător.
- Circa 60% din speciile ionice detectate corespund unor fragmente mono sau multiplu deshidratate ceea ce ar fi explicabil dacă avem în vedere temperatura de transfer la desolvatare (315°C).
- Asigurarea unui semnal constant și alegerea judicioasă a parametrilor de lucru ne-a permis să izolăm ionul monoîncărcat de la  $m/z = 1983.71$  care a fost secvențializat (conducând la spectrul  $MS^2$ ), mer cu mer până la dizaharida cap de serie corespunzătoare fragmentului de la  $m/z = 525.24$ . Aceasta a fost izolată și fragmentată prin CID pentru a produce spectru  $MS^3$ .

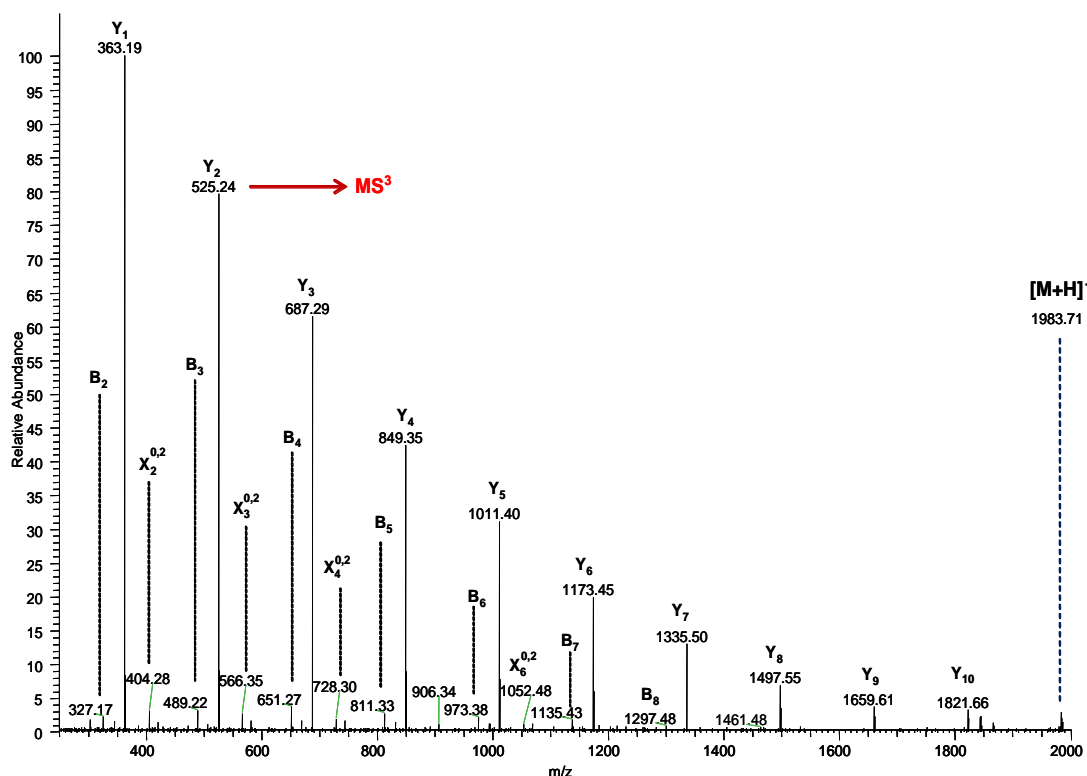


Figura 7 Spectrul  $MS^2$  al ionului  $[M+H]^+$  de la  $m/z=1983.71$  corespunzător  $[PARA11+H]^+$  obținut prin CID și fragmentare multiplă (la o energie de coliziune variabilă din intervalul 30-70 eV); concentrația probei: 1ng/1; tensiunea pe sursă 0.9kV; temperatura pe capilar 250°C; solvent: alcool metilic: apă (9:1); fereastra de izolare a ionului precursor 2 a.m.u.; (în descrierea ionilor de fragmentare s-a adoptat nomenclatura după Dommon și Costelo [28])

**Bibliografie (selectivă):**

1. **Novaconi C.R**, Onulov R, Serb A.F, Sisu E, Dinca N, Pascariu M.C, Georgescu M, Assessing Glycosphingolipid Profiles in Human Health and Disease Using Non-Imaging MALDI Mass Spectrometry. *Appl.Sci.*, 2023; 13(7): 9922. <https://doi.org/10.3390/app13179922>
2. Serb A.F, Georgescu M, Onulov R, **Novaconi C.R**, Bolocan A, Sandu R.E, Mass-Spectrometry-Based Research of Cosmetic Ingredients. *Molecules*, 2024; 29(6): 1336. <https://doi.org/10.3390/molecules29061336>
3. Serb A.F, **Novaconi C.R**, Georgescu M, Puiu M, Dema A, Onulov R, Sisu E, Preliminary Analysis of the Glycolipid Profile in Secondary Brain Tumors, *Biomed Res. Int.* 2022, 1: 4293172. <https://doi.org/10.1155/2022/4293172>
4. **Novaconi CR**, Dema A, Georgescu M, Sisu E, Serb AF. Manuscript submitted for publication.