



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

3. KONFERENCIE

CENTRA EXCELENTNOSTI

Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich prevencie



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

Recenzent

RNDr. Jana Bellová, PhD.

chemjbel@savba.sk

Editor

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

chemsedm@savba.sk

Ing. Mária Kopáčová

chemmari@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0

PREDSLOV

Zborník krátkych vedeckých príspevkov vznikol ako výsledok iniciatívy Chemického ústavu SAV, v. v. i. a jeho vedeckých tímov, ktoré pracujú v oblasti živých vied a sú financované z národných zdrojov a zo zdrojov, ktoré boli pridelené úspešným projektom zo zahraničia, najmä zo štrukturálnych fondov EÚ. Cieľom je oboznámiť vedeckú komunitu s výsledkami výskumu, a tak vytvoriť platformu pre ďalšiu perspektívnu spoluprácu v oblasti pochopenia štruktúrnych a funkčných aspektov biologických procesov živých systémov. Má prispieť k spoznaniu a zosilneniu spolupráce v rámci regiónu, príp. aj za jeho hranicami, vytvoriť neformálnu spoluprácu na úrovni uplatnenia technologického pokroku multiomických platforiem pri pochopení vzniku chorôb a ich prevencie. Organizátori chcú týmto poďakovať všetkým prispievateľom, ktorí sa podieľali na príprave tohto zborníka a veria, že úspešná spolupráca bude pokračovať aj v nasledujúcich projektoch.

Obsah

- 1. Stanovenie N-glykoprotílu mikrovezikúl, potenciálneho zdroja nových glykobiomarkerov**
Zuzana Pakanová¹, Veronika Lukáčová¹, Marek Nemčovič¹, Jaroslav Katrlík¹, Ján Mucha¹, Peter Baráth¹
- 2. In vivo NMR monitoring of [1-¹³C]-glucose biotransformation by *Bacillus* sp. PDD-3b-6, bacterium isolated from cloud water**
Mária Matulová¹, Martine Sancelme² Mounir Traikia² and Anne-Marie Delort²
- 3. Biotransformation of maltose to maltobionic acid by *Bacillus* sp. PDD-3b-6, bacterium isolated from cloud water**
Mária Matulová¹, Martine Sancelme², Pierre Amato² and Anne-Marie Delort²
- 4. Cellobionic and Lactobionic acids produced by *Bacillus* sp. PDD-3b-6, bacterium isolated from cloud water**
Mária Matulová¹, Martine Sancelme², Pierre Amato² and Anne-Marie Delort²
- 5. Monitorovanie hladiny Glc4 u Pompe pacientov pomocou ¹H NMR**
Mária Matulová¹, Iveta Uhliariková¹, Anna Šalingová², Anna Hlavatá³
- 6. N-glykoprotílieia fibroblastov pre štúdium zmien v ľudskom glykóme**
Rebeka Kodríková, Maroš Krchňák, Filip Květoň, Zuzana Pakanová, Peter Baráth, Ján Mucha, Marek Nemčovič
- 7. Monitoring zmien hladín glykobiomarkerov alfa-manozidózy pomocou HPLC-FLD**
Maroš Krchňák¹, Rebeka Kodríková¹, Marek Nemčovič¹, Ján Mucha¹, Zuzana Pakanová¹
- 8. Influence of silver incorporation on chemical bonding in plasma polymerized hemamethyldisiloxane based metal/polymer nanocomposite films**
Vitalii Izai^a, Tomáš Fiantok^a, Tomáš Roch^b, Štefan Nagy^c, M. Pop^d, Peter Kúš^b, Marian Mikula^{b,c}
- 9. Mechanical properties of silver nanoparticle-based thin films prepared by high target utilization sputtering**
T. Fiantok^{1,*}, V. Izai¹, M. Truchlý¹, M. Vidiš¹, T. Roch², Š. Nagy³, Marián Haršáni⁴, P. Kúš³, M. Mikula^{2,3}
- 10. Antibakteriálny povlak na báze striebrom dopovaného diboritu titánu**
Marek Vidiš¹, Martin Truchlý¹, Vitalii Izai¹, Tomáš Fiantok¹, Miroslav Rajnec², Tomáš Roch³, Leonid Satrapinsky³, Marián Haršáni⁴, Peter Kúš³ and Marián Mikula³
- 11. Pilot study: the comparison of serum N-glycoprotíles of Wistar and SHR rats**
Zuzana Brnoliaková¹, Zuzana Pakanová², Lucia Racková¹, Marek Nemcovic²
- 12. The assessment of glucometabolic hormones in blood serum of aging rats fed with high-fat diet**
Zuzana Brnoliaková, Lucia Racková

- 13. Hexahydropyridoindoles as potential inducers of cellular antioxidant and anti-inflammatory response**
Lucia Rackova, Zuzana Brnoliakova
- 14. Vplyv molekúl striebra na rastovú krivku *E. coli***
Miroslav Rajnynec^{1,2}, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹
- 15. Inhibičný efekt nanočastíc striebra proti vláknitej mikroskopickej hube *Trichoderma harzianum***
Miroslav Rajnynec^{1,2}, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹
- 16. Stanovenie obsahu uvoľneného striebra metódou ICP-OES a jeho vplyv na antibakteriálny potenciál**
Miroslav Rajnynec^{1,2}, Marián Tomka³, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹
- 17. Antivírusový efekt striebra na niektoré modelové vírusové kmene**
Andrea Gažiová^{1,2}, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹
- 18. Antibody-mediated immune responses against rare facultative pathogen *Candida utilis* in atopic patients with vulvovaginal candidiasis. Glucomannan as a new serologic biomarker**
Ema Paulovičová¹, Martin Hrubisko²
- 19. Príprava a antimikrobiálne vlastnosti kvarternizovaných polysacharidov mikrobiálneho pôvodu**
Romana Vrzoňová, Alžbeta Čížová, Jana Mečárová, Slavomír Bystrický
- 20. Porovnanie modelov glykozidtransglykozyáz vytvorených pomocou programov Modeller a AlphaFold**
Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 21. Čiastočná biochemická charakterizácia proteínu UniProtKB Q75XT0**
Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 22. Elektrostatický potenciál povrchov exoglykozidhydroláz rodiny 28**
Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 23. Teoretická stabilita komplexu enzým-substrát a experimentálne stanovenie enzýmovej aktivity**
Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 24. Umiestnenie a počet lyzínových zvyškov v C-terminálovej sekvencii vybraných glykozidtransglykozyáz a ich schopnosť viazať nabité akceptory**
Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 25. Elektrostatický potenciál C-terminálovej sekvencie glykozidtransglykozyáz podrodiny 16_20**
Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 26. Vplyv polohy 1,3-glykozidickej väzby na stabilitu komplexu enzým (PttXET16A) – donor – akceptor β -(1,3;1,4)-D-glukotetrasacharid)**
Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

- 27. Vplyv mutácie Q108R na stabilitu komplexu enzým (TmXET6.3) – donor - akceptor**
Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 28. Vplyv mutácie H94Q na stabilitu komplexu enzým (TmXET6.3) – donor - akceptor**
Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 29. Dokovanie oligosacharidov do aktívneho miesta glykozidhydrolázy rodiny 28 podľa templátu 2uvf.pdb**
Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová
- 30. Štúdium *in silico* vybraných polyfenolických látok ako inhibítorov Mpro vírusu SARS-CoV-2**
Jana Viskupičová¹, Petronela Rezbáriková¹, Lucia Kováčiková^{1,2}, Peter Šramel^{1,2} a Magdaléna Májeková¹
- 31. Identifikácia inozitolov v rastline *Stellaria media* hmotnostnou spektrometriou**
Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý¹
- 32. Inozitoly identifikované v kvetoch *Magnolia soulangeana* hmotnostnou spektrometriou s trojitým kvadrupólom**
Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý¹
- 33. Deficit prolíndehydrogenázy: Metodika na diagnostiku NMR spektroskopiou**
Iveta Uhliariková¹, Mária Matulová¹, Anna Šalingová²
- 34. On the Identification and Spontaneous Decomposition of Two Galloyl Depsides from *Pistacia atlantica* Desf.**
Michal Šoral¹, Sultan Pekacar², Didem Şöhretoğlu³, Didem Deliorman Orhan²
- 35. Prítomnosť glukózy a inulínu v infúzii a výluhu z rastliny *Siraitia grosvenori***
Viera Dujnič¹, Mária Matulová¹, Andrej Chyba¹, Vladimír Pätoprstý¹
- 36. Stanovenie vybraných pyrolizidínových alkaloidov v suchých rastlinných extraktoch pomocou HPLC-MS**
Andrej Chyba, Viera Dujnič, Vladimír Pätoprstý
- 37. Experimental and theoretical study of inhomogeneous lyophilization**
Krošlákova S¹., Klčová K²., Matejčíková A²., Kopáčová M³., Pätoprstý V³., Rajniak P^{1,2}
- 38. Research of inhomogeneous lyophilization and development of methods for the stabilization of samples**
Krošlákova S¹., Pakanová Z³., Rajniak P^{1,2}., Mucha J³

Stanovenie N-glykoprotílu mikrovezikúl, potenciálneho zdroja nových glykobiomarkerov

Zuzana Pakanová¹, Veronika Lukáčová¹, Marek Nemčovič¹, Jaroslav Katrlík¹, Ján Mucha¹, Peter Baráth¹

¹*Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava*

Úvod

Mikrovezikuly sú extracelulárne vezikuly, ktoré vznikajú oddelením z bunkových membrán a uvoľňujú sa do extracelulárneho priestoru (do tkanív, telesných tekutín a pod.). Nie je možné ich uniformne charakterizovať a striktne definovať na báze hustoty, veľkosti, či tvaru (Simons a Raposo, 2009). Bunky tvoria mikrovezikuly na uľahčenie kontroly kvality nasyntetizovaných proteínov na plazmatickej membráne a voľné mikrovezikuly prenášajú signály, proteíny a RNA do susedných buniek. Podieľajú sa na mnohých fyziologických procesoch, najmä počas imunitnej signalizácie a pri rôznych ochoreniach, najmä imunodeficienciách a rakovine. Z tohto dôvodu predstavujú nový a doposiaľ neprebádaný zdroj potenciálnych biomarkerov. V prezentovanej práci bol stavený celkový N-glykoprotíl proteínov obsiahnutých v izolovaných mikrovezikulách z krvného séra.

Materiál a metódy

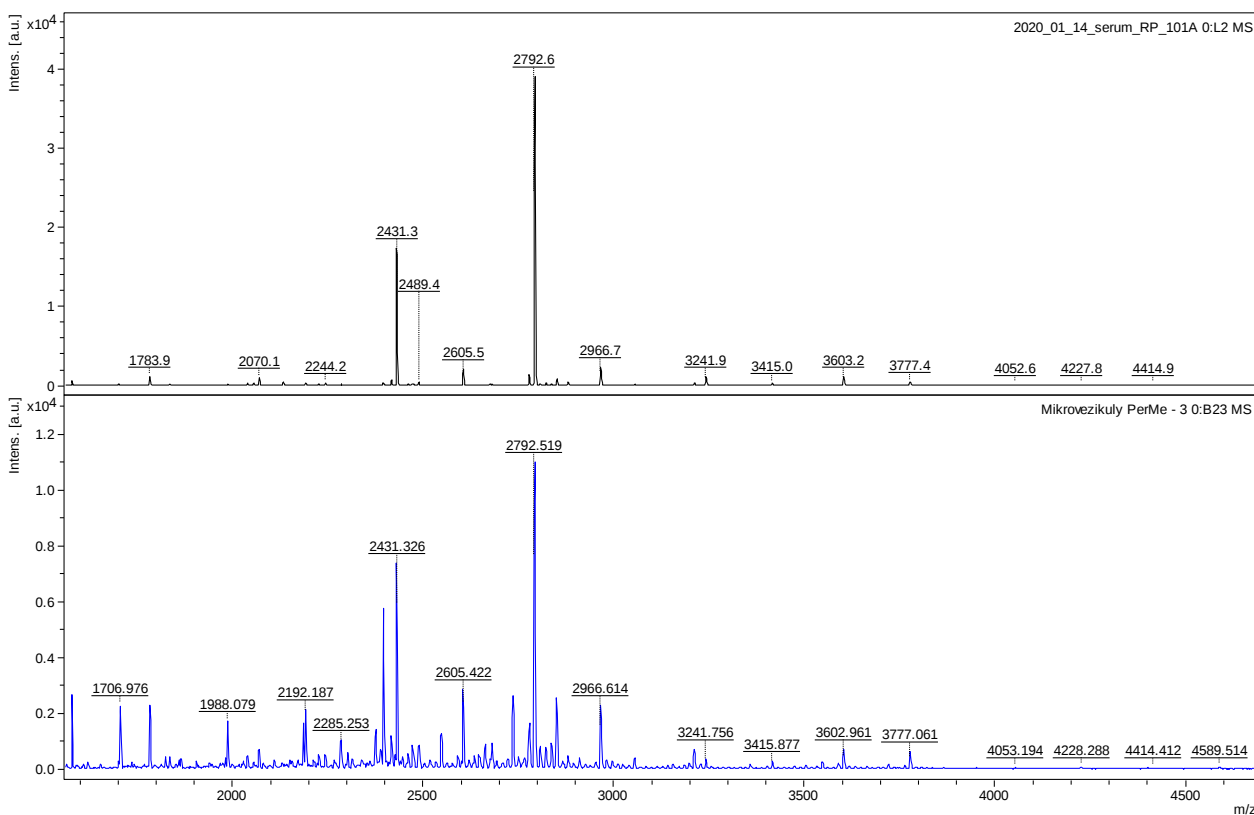
500 mikrolitrov séra, získaného homogénnym zlúčením sér 10 zdravých dospelých jednotlivcov (5 mužov a 5 žien) do jednej reprezentatívnej vzorky, bolo použitých na izoláciu mikrovezikúl prostredníctvom kitu Izon70 (Izon Science SAS, Francúzsko). Mikrovezikuly boli zo vzorky izolované frakciáciou podľa pokynov výrobcu.

Izolované mikrovezikuly boli podrobené tepelnej denaturácii s prídavkom SDS a po ochladení na izbovú teplotu bola pridaná peptid-N-glykozidáza F (Roche, Švajčiarsko). Vzorka bola inkubovaná cez noc a uvoľnené glykány boli izolované na poróznom grafitizovanom uhlíku a predanalyticky derivatizované permetyláciou.

Spektrá boli namerané na hmotnostnom spektrometri MALDI ultrafleXtreme II (Bruker, Nemecko) a porovnané so spektrami získanými obdobným spôsobom zo séra bez predchádzajúcej izolácie mikrovezikúl (negatívna kontrola).

Výsledky a diskusia

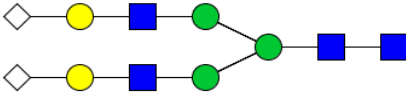
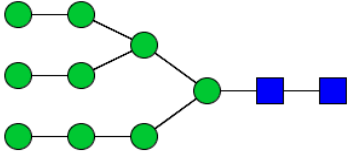
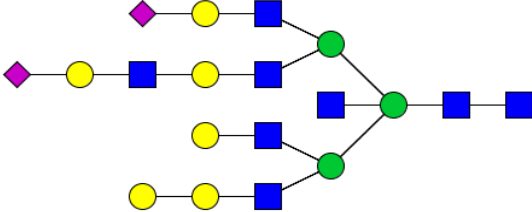
Uvedenými postupmi bol stanovený N-glykoprofil sérových mikrovezikúl, ktorý obsahoval štruktúry v rozmedzí približne m/z 1,500-4,800. Spektrum, získané analýzou N-glykánov z mikrovezikúl, porovnané so spektrom získaným zo samotného séra (negatívnej kontroly), je znázornené v Obr. 1.



Obr.1: MALDI-TOF-MS spektrum permetrylovaných N-glykánov, získaných špecificky z obsahu mikrovezikúl (modré spektrum), porovnané s N-glykoprofilom sérových proteínov. Spektrá boli merané v reflektónovom pozitívnom iónovom móde, s pridaním 2,5-dihydroxybenzoovej kyseliny ako externej matrice.

V spektrách N-glykoprofilu obsahu mikrovezikúl boli pozorované výrazné signály oligohexózových jednotiek, ktoré pravdepodobne nepochádzajú z proteínov, ale nachádzajú sa vo vezikulách vo voľnej forme (kontaminanty). Okrem toho, niektoré N-glykány boli špecificky prítomné v mikrovezikulách vo výrazne zvýšených hladinách, a to najmä štruktúry uvedené v Tab1.

Pôvod týchto N-glykánov nie je známy, preto ďalším krokom bude stanovenie proteomického obsahu, prípadne analýza glykoproteínov, izolovaných špecificky z mikrovezikulových frakcií.

m/z	Štruktúra	Popis
m/z 2736		Hex5HexNAc4Neu2
m/z 2396		Hex9HexNAc2
m/z 4590		Hex9HexNAc8NeuAc2

Tab.1. Reprezentatívne N-glykány, pozorované v mikrovezikulách vo zvýšených hladinách porovnaním so sérom.

Štúdium obsahu mikrovezikúl je môže viesť k objaveniu nových relevantných a špecifických biomarkerov rôznych ochorení, najmä metabolických či onkologických. Ku dnešnému dňu neboli popísané žiadne glykobiomarkery, obsiahnuté vo vezikulách a preto štúdium tejto problematiky predstavuje vysoký vedecký potenciál. V ďalších krokoch sa budeme venovať proteomickej analýze obsahu mikrovezikúl a záverom bude korelácia glykomických a proteomických dát.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4 a projektom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

Gould SJ, Schaffer JE. Transport and Secretion | Exosomes and Microvesicles, Editor(s): Jez J. Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition), Elsevier, 2021:455-458, ISBN 9780128220405. doi: 10.1016/B978-0-12-819460-7.00245-0

Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr Opin Cell Biol. 2009;21(4):575-581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007

In vivo NMR monitoring of [1-¹³C]-glucose biotransformation by *Bacillus* sp. PDD-3b-6, bacterium isolated from cloud water

Mária Matulová¹, Martine Sancelme² Mounir Traikia² and Anne-Marie Delort²

¹Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia
chemmatu@savba.sk

²Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), UMR6096 CNRS-UCA-Sigma, Clermont-Ferrand, France

Introduction

Bacillus sp. PDD-3b-6, bacterium isolated in cloud water, was a subject of our study for many years. Particularly, a biotransformation of sugars and other substances, usually encountered in the atmosphere by this microorganism. We have shown that on high glucose concentration this bacterium produces exo-polymeric compounds (Matulova, 2014). Here we evaluate results of *in situ* and *in vivo* incubations of this bacterium on low concentration of [1-¹²C]-D-glucose and [1-¹³C]-D-glucose, respectively.

Material and methods

In vivo ¹³C NMR: Bacterial suspension was diluted with Volvic water (with 10% of D₂O) to obtain final volume 150ml. Suspension was placed into a tempered water bath (27°) with oxygen perfusion. Equipment for *in vivo* NMR was set up (Fig. 1). Into 10 mm NMR sample tube a sealed capillary with benzene (external standard for chemical shift calibration) was inserted. After a perfusion stabilisation [1-¹³C]-Glucose (300 mg) was added into bacterial suspension and the first spectrum was registered. Subsequently a series of ¹³C NMR spectra were measured (each with 1 000 scans, overnight, 19.5h). Samples of bacterial suspension *t*₃ and *t*₂₄ were taken after 3 h and 24 h of incubation and centrifuged (3 min, 12 500 rpm). Supernatants and sediments containing cells were stored at -40°C until their detailed NMR analyses.



Fig. 1 Perfusion system for *in vivo* NMR described by Chorao et al. 2009.

Perchloric acid extract preparation: PCA extracts were prepared according Chorao et al. 2009. Briefly, cells (10 g wet weight) were quickly frozen in liquid nitrogen and thawed several times to ensure disruption of cells. Then 1 mL of 70 % (v/v) perchloric acid was added to the solution. Suspension was centrifuged (15 000 g, 15 min, 4 °C) to remove matter; supernatant pH was adjusted to 5.0 using KHCO₃, followed by centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) to remove KClO₄ and resulting supernatant was frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. Freeze-dried material, containing non-volatile compounds, was re-dissolved in 2.5 ml of water containing 10 % (v/v) D₂O, neutralized

to pH 7.5 with 5 M KOH and buffered with 50 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). Divalent cations (particularly Mn^{2+} and Mg^{2+}) were chelated by addition of enough amounts of CDTA ranging from 50 to 100 mM depending on the sample. Chelating of paramagnetic cations is a prerequisite for obtaining sharp resonance signals during the NMR experiments. The main advantage of this technique is that during the cell disruption the proteins are eliminated from the sample and thus it is less complicated to observe the intracellular metabolites of sugar origin.

Results and Discussion

Fig. 2 Shows ^{13}C NMR spectra of the *in vivo* monitoring of [^{13}C -1]-glucose consumption by *Bacillus* sp. PDD-3b-6. Detailed analyses of *in vivo* ^{13}C NMR spectra from kinetic of the [^{13}C -1]-glucose degradation and those of the supernatant samples **t3** and **t24** have shown that succinate, lactate and acetate were the most abundant metabolites. In the sample taken **t3** the ^{13}C label was incorporated only into lactate and acetate with an enrichment 29% and 16%, respectively. Succinate was not enriched (spectra not shown). However, in the 1H NMR spectra (Fig. 3A) of samples of cell extracts **t3** and **t24** prepared from broken cells in sediments, the diagnostic anomeric H1 NMR signal at δ 5.167 ppm due to not labelled MBA is present. MBA was the dominant metabolite in the **t24** sample. In cells MBA was found not ^{13}C enriched. This fact suggests that its production is linked with internal processes of bacterial metabolism (or internal deposits of glucose) and its formation seems to be substrate independent. Fig. 3B shows a comparison of 1H NMR spectra of samples from incubation media on [^{13}C -1]-glucose (96h - ^{13}C Glc t96 and 89h- ^{13}C Glc t89), and not labelled [^{12}C -1]-glucose (39h - ^{12}C Glc t39 and 63h - ^{12}C Glc t63). In samples ^{12}C Glc t39 and ^{12}C Glc t63 the presence of the diagnostic MBA H1 singlet signal at δ_{H1} 5.167 ppm is evident, while in samples ^{13}C Glc t96 and ^{13}C Glc t89 this signal is absent/disappearing in noise. It means that no unlabelled MBA was excreted from cells. However, instead of the anomeric signal at δ_{H1} 5.167 a doublet signal, with chemical shift corresponding to δ_{H1} 5.167 of MBA. It was split due to an interaction with $^{13}C1$ ($^1J_{H1-^{13}C}$ 170.2 Hz) due to [^{13}C -1]-glucose confirm the presence of ^{13}C labelled MBA. We can deduce that in this case MBA should be synthesized extracellularly.

Production of MBA by this bacterium was later discovered in incubation media on other sugar substrates – on fructose, maltose, sucrose, turanose and trehalose. In all cases, the most important quantity of MBA was produced in time interval 39 – 48 hours, in the case of turanose at 72 h of incubation. It was further degraded within 5 to 8 hours without its accumulation in incubation medium.

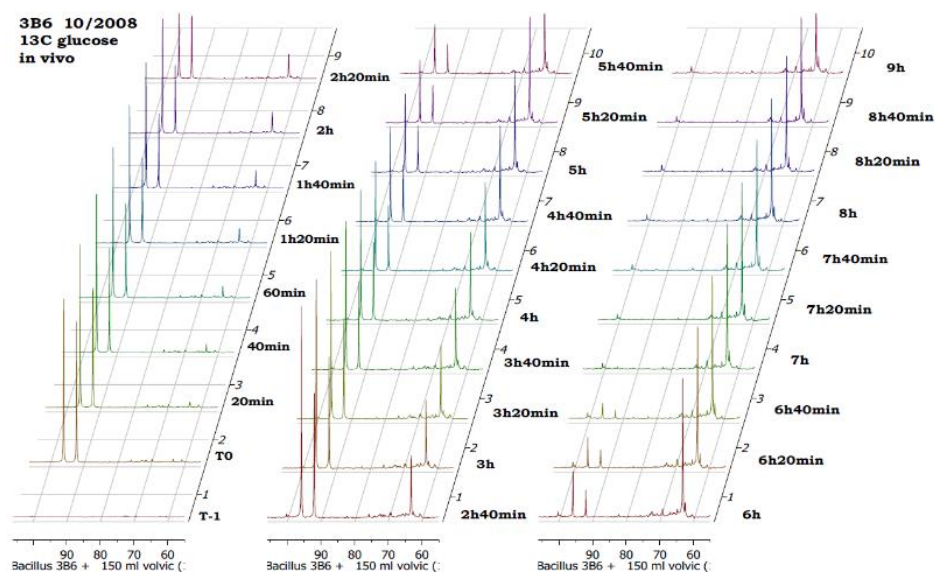


Fig. 2 *In vivo* ^{13}C NMR kinetic of ^{13}C -1-glucose degradation by *Bacillus* sp. PDD-3b-6.

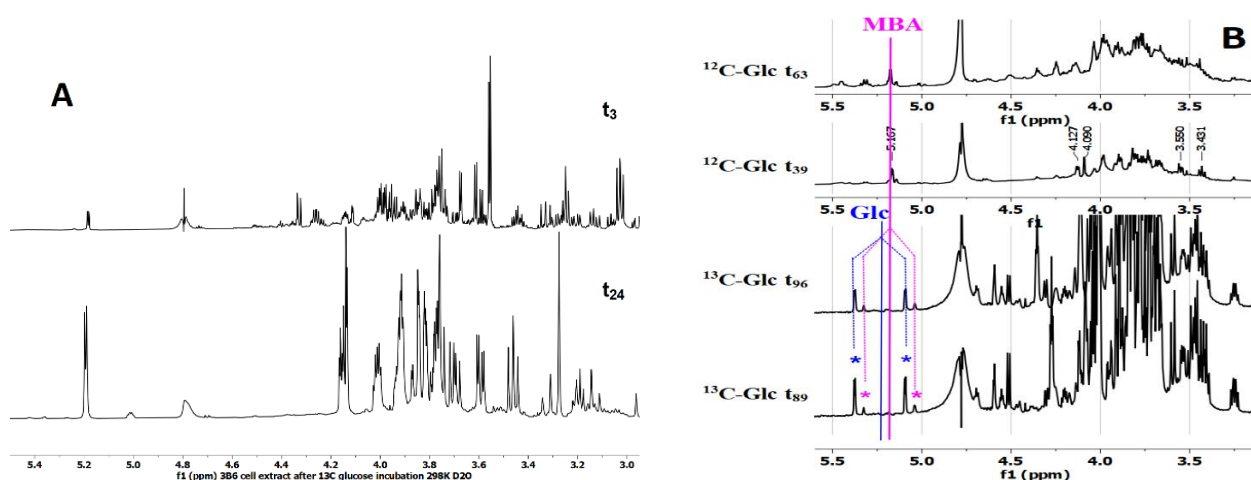


Fig. 3A ^1H NMR spectra of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 cell extracts taken from the incubation medium with ^{13}C -1-glucose at 3 and 24h of incubation. Fig. 3B ^1H NMR spectra of samples taken from incubation media of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 on ^{13}C -1-glucose (96h - ^{13}C Glc t96 and 89h - ^{13}C Glc t89), and ^{12}C -1-glucose (39h - ^{12}C Glc t39 and 63h - ^{12}C Glc t63). * - anomeric H1 signal of glucose is split into a doublet due to $^1J_{\text{H-C}}$: blue from the substrate - labelled ^{13}C -1-glucose; pink - from the product ^{13}C -1-glucose in MBA. Region of carbohydrates is shown only.

Acknowledgements

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Study of structural changes of complex glycoconjugates in the process of inherited metabolic and civilization diseases, ITMS: 313021Y920, and project: Integration of multiomics study

results and biotechnological production of biologically important substances, ITMS 313011T560, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

M. Matulová, S. Husárová, P. Capek, M. Sancelme, and A.-M. Delort. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 14238–14247. Doi: 10.1021/es501350s

C. Choraó, M. Traikia, P. Besse-Hogan, M. Sancelme, R. Bligny, E. Gout, G. Mailhot and A.-M. Delort. *J. Appl. Microbiol.* 108 (2010) 1733-1743. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04577.x

Biotransformation of maltose to maltobionic acid by *Bacillus* sp. PDD-3b-6, bacterium isolated from cloud water

Mária Matulová¹, Martine Sancelme², Pierre Amato² and Anne-Marie Delort²

¹Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia
chemmatu@savba.sk, ²Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), UMR6096 CNRS-UCA-Sigma, Clermont-Ferrand, France

Introduction

The capacity of microorganisms to biotransform low value and waste compounds to high added value products is a topic with wide industrial and environmental interests. Aldobionic acids (ABA), lactobionic (LBA), maltobionic (MBA) and cellobionic (CBA), are attractive due to their properties and numerous applications in different branches of industry, health sector or cosmetology, and their market is growing. ABA are prepared from corresponding disaccharides (lactose, maltose and cellobiose, respectively) by oxidation of the aldehyde group of the reducing end glucose to a carboxyl. Oxidation can be achieved by many ways; electro-chemically, chemically, through heterogeneous catalysis, enzymatically or by biocatalytic oxidation. Industrially used oxidation processes are tackling many problems such regeneration of costly metal catalysts (Pd, Au) or enzymes, impurities present in the form of residual solvents or metals, and random oxidation processes leading to a mixture of oxidized products (Vedovato et al. 2020). Separation techniques, inevitable to obtain pure products or a well-defined mixture, increase products costs. Selective biocatalytic oxidation by microorganisms can lead straightforward to a desired product. Bioproduction of lactobionic acid (LBA) is the most studied due to a cheap starting substrate for its production, which influence its emerging applications.

Both MBA (α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-gluconic acid) and CBA (β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-gluconic acid) have similar physico-chemical properties as LBA. Due to its humectant properties and dermato-protective effect, MBA has important applications in dermatology and cosmetology, in the medical field due to its strong radical scavenging property it is used as a preservative for organs intended for transplantation, and recent studies revealed other health benefits (Tanabe et al. 2020; Suehiro et al. 2020, 2022). Demand for MBA on the market is growing due to its numerous applications in textile, oil and refining industry, for household cleaning products, in food industries for food preservation as well as in building industry. Depending on the application, different grades of MBA purity (cosmetic or industrial) are required. Cheaper MBA production solutions by bio-fermentation of low-cost substrates are also investigated, from high maltose corn syrup (Oh et al. 2020a, 2022a) or waste cooked rice (Oh et al. 2022b).

Some bacterial strains, most frequently affiliated with *Pseudomonas*, can directly oxidize lactose and maltose to LBA and MBA, respectively, and then use these sugars as carbon sources (Kluyver et al. 1951). Such reutilization of LBA and MBA as a source of carbon was not observed in *B. cepacia* indicating distinct functioning (Murakami et al. 2002).

Bacillus sp. PDD-3b-6, a bacterial strain isolated from cloud water phase of tropospheric clouds (Genbank accession number DQ512741) has numerous metabolic properties of interest regarding sugar catabolism, contaminants such as herbicides (Durand et al., 2006), or volatile

compounds present in the atmosphere (Husarova et al. 2011). Special properties of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 were discovered during a screening of its capacity to metabolize carbohydrates on sucrose or high concentration of glucose were already described in Matulova et al. 2011 and Matulova et al. 2014.

Study of degradation of different sugars in pure water by *Bacillus* sp. PDD-3b-6 sugars resulted in a revelation of its capacity to biotransform some of these sugars to ABA. Here we describe MBA production by this bacterium in pure water on different sugar substrates, which were the only carbon source.

Key words: aldobionic acids, maltobionic acid, *Bacillus* sp. PDD-3b-6, sugar metabolism, NMR

Material and methods

Already described in Matulova et al. 2011 and Matulova et al. 2014.

Results and Discussion

The ability of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 to degrade a variety of saccharides was studied by in situ ^1H NMR spectroscopy (Matulova et al. 2014). Diverse saccharides were examined, including pentoses and hexoses, oligo- and polysaccharides as well as acyclic alditols. According degradation rates the tested substrates could be divided into 3 groups: i) substrates completely degraded within 24 – 48 hours of incubation; ii) slowly degraded substrates: their concentration slowly decreased, and only traces of substrates were present at the end of the incubation (96 - 128h); iii) substrates not degraded.

In some cases, the presence of new metabolites with a disaccharide structure was observed. In sample taken after 4h incubation on maltose signals of new metabolite appeared at δ_{H1} 5.167 ppm. They became the only ones in the sample taken after 39h, used for detailed NMR analysis. It was identified as MBA (Table 1). MBA was further used by bacterium when all maltose was consumed.

Table 1 NMR data of MBA and CBA in D_2O at 25°C .

	Position H/C	1	2	3	4	5	6	6'
Glc α (1 $\rightarrow$ 4)	δ_{H}	5.167	3.586	3.768	3.46	3.93	3.85	3.80
	$^3\text{J}_{\text{HH}}$ (Hz)	4.1	10.3	9.9	9.9	2.2	4.8	12.0
	δ_{C}	101.36	72.68	73.90	70.32	73.42	61.34	
GlcA	δ_{H}		4.137	4.156	3.92	4.013	3.83	3.697
	$^3\text{J}_{\text{HH}}$ (Hz)		2.6	6.2	3.4	3.8	7.7	11.9
	δ_{C}	179.35	73.60	73.35	83.30	73.37	63.1	
Glc β (1 $\rightarrow$ 4)	δ_{H}	4.62	3.34	3.50	3.40	3.45	3.90	3.72
	δ_{C}	105.68	76.10	78.23	72.16	76.10	63.27	
GlcA	δ_{H}	-	4.15	4.08	4.00	3.98	3.85	3.75
	δ_{C}	180.96	75.07	74.22	84.48	74.47	64.47	

COSY and HSQC spectra of the sample containing only MBA (on maltose at 39h) showed characteristic spectral patterns of cross peak signals due to MBA (Fig. 1, spectra C and F, respectively). The same spectral patterns were revealed in COSY and HSQC of samples on sucrose (β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside) and turanose (α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-fructopyranose) giving an evidence about MBA formation also on these substrates. Screening of COSY and HSQC spectra of all samples, taken at

different time intervals and for different sugars, was performed. Fig. 1 shows also as an example COSY (A, B, C) and HSQC (D, E, F) spectra of incubation media with fructose and glucose (Glc 39h; B, E). In these samples MBA was the only/nearly only metabolite, showing characteristic spectral patterns of MBA.

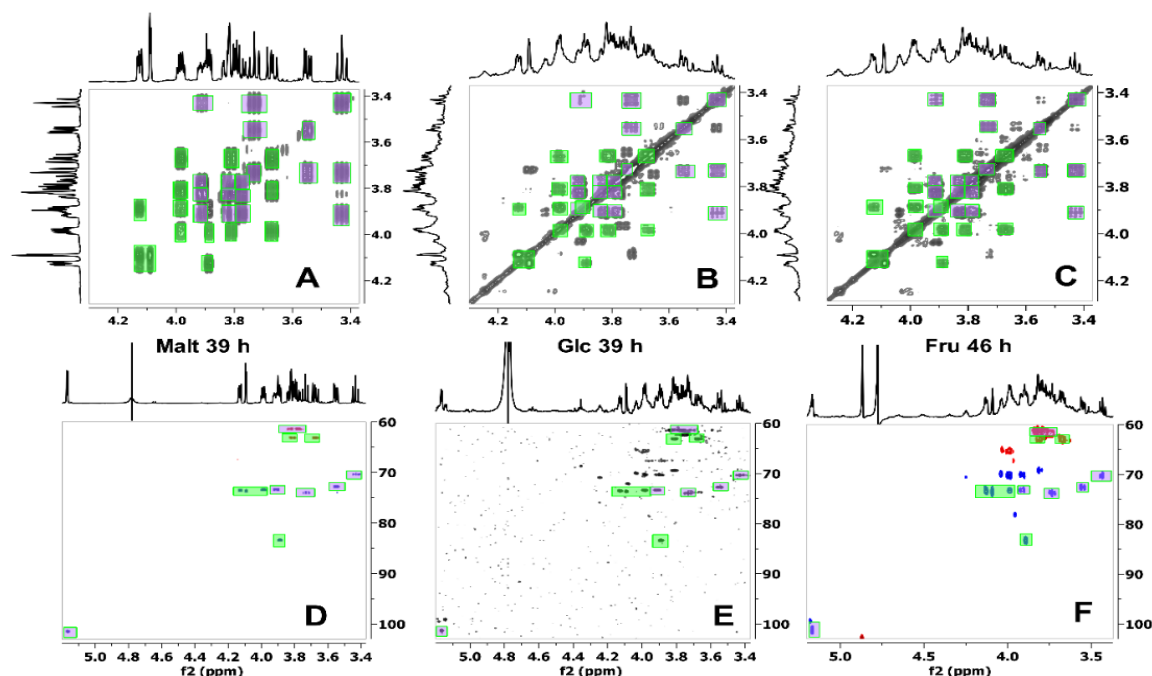


Fig. 1 Characteristic MBA spectral pattern in COSY (A, B, C) and HSQC (D, E, F) spectra: incubation media of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 with: fructose after 46 h of incubation (Fru, A and D, respectively); glucose after 39 h (Glc, B and E, respectively); maltose after 39 h (Malt, C and F, respectively). Colours: Green - acyclic part of the molecule (aglycon), violet – cyclic part of the molecule (at the non-reducing end).

Six other strains of *Bacillus* spp. (*B. amyloliquefaciens* CIP 103256T*, *B. cereus* ATCC 14579*, *B. licheniformis* ATCC 21733, *B. megaterium* DSM32*, *B. sphaericus* ATCC 10208*, *B. subtilis* CIP 52.65*) and *Pseudomonas fluorescens* CIP 69.13 have been tested under identical incubation conditions for their capacity to produce MBA from maltose. MBA was detected only in the incubation medium of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 and *P. fluorescens* CIP 69.13.

Fig. 2 shows structures of carbohydrate substrates (glucose, fructose, maltose, sucrose, trehalose, and turanose) on which *Bacillus* sp. PDD-3b-6 has the capacity to produce MBA. These sugars were directly transformed into MBA without any intermediate compound. On maltose, trehalose, sucrose and turanose the non-reducing glucose unit has an α -configuration. On cellobiose, with β -configuration of the non-reducing glucose unit, bacterium produced CBA as the only metabolite present in the medium. Furthermore, biotransformation of lactose led only to a mixture of

metabolites including LBA. These observations indicate that during syntheses of these ABA no cleavage of the inter-glycosidic linkage takes place.

The main difference between disaccharide structures in Fig. 2 resides in the reducing end sugar: glucose in maltose and trehalose; fructose in sucrose and turanose. This indicates that different enzymes should be involved into their transformation into a gluconic acid to form MBA. However, the situation is different in trehalose as in its molecule two α -glucose units are C1-C1' inter-glycosidically linked. Here, anomeric centres are blocked for an oxidation.

Further studies are necessary to explain the mechanism of MBA production or type of enzymes involved in MBA production by *Bacillus* sp. PDD-3b-6. Nevertheless, the sugar metabolism study of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 led to surprising information: the capacity of this bacterium to produce MBA on different sugars and CBA on cellobiose in pure water. Obtained results are of great biotechnological interest because of a simple process of MBA isolation and purification.

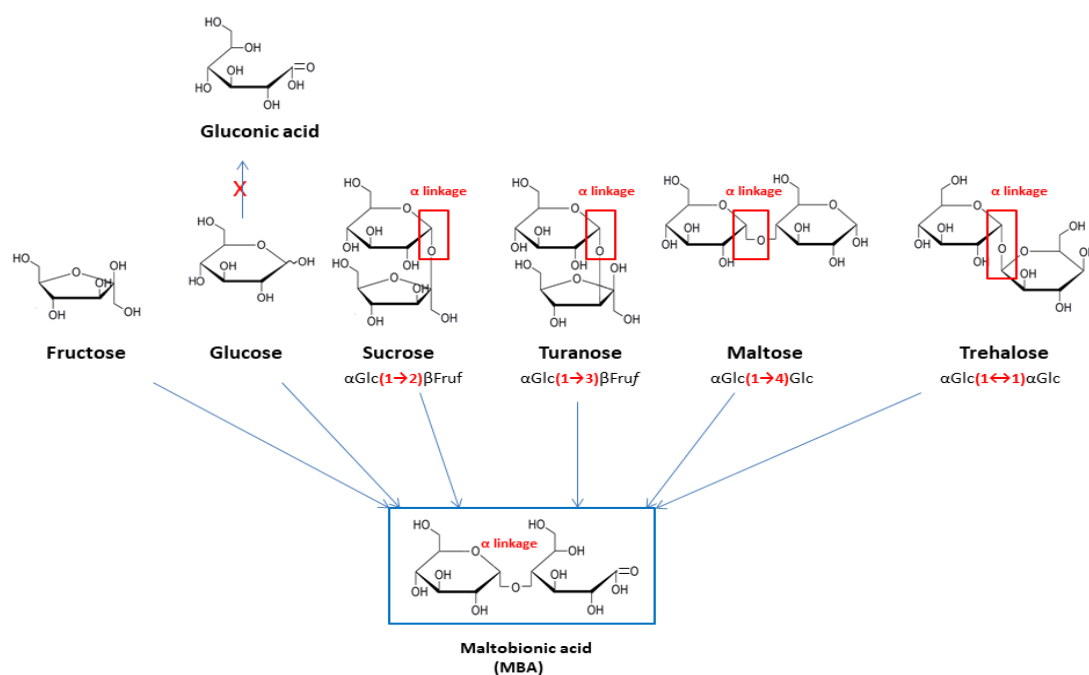


Fig. 2. Sugars directly biotransformed to MBA by *Bacillus* sp. PDD-3b-6 in pure water.

Acknowledgements

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Study of structural changes of complex glycoconjugates in the process of inherited metabolic and civilization diseases, ITMS: 313021Y920, and project: Integration of multiomics study results and biotechnological production of biologically important substances, ITMS 313011T560, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

- Durand, S, Amato, P, Sancelme, M, Delort, AM, Combourieu, B, Besse-Hogan, P (2006) First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Lett App Microbiol* 43: (2), 222-228. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01923.x>
- Husarova S, Vaitilingom M, Deguillaume L, Traikia M, Vinatier V, Sancelme M, Amato P, Matulova M, Delort AM (2011) Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry. *Atmos Environ* 45: 6093-6102. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.06.035>
- Kluyver AJ, De Ley J, Rijven A (1951) The formation and consumption of lactobionic and maltobionic acids by *Pseudomonas* species. *Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol* 17: 1-14.
- Matulová M, Husárová S, Capek, P, Sancelme M, Delort A-M (2011) NMR structural studies of fructans produced by *Bacillus* sp 3B6, bacterium isolated from clouds. *Carbohydr Polym* 346: 501-507. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.012>
- Matulová M, Husárová S, Capek P, Sancelme M, Delort A-M (2014) Biotransformation of Various Saccharides and Production of Exopolymetric Substances by Cloud-Borne *Bacillus* sp. *PDD-3b-6*. *Environ Sci Technol* 48: 14238–14247. <https://doi.org/10.1021/es501350s>
- Murakami H, Seko A, Azumi M, Kiso T, Kiryu T, Kitahata S, Shimada Y, Nakano H (2006) Microbial Conversion of Lactose to Lactobionic Acid by Resting Cells of *Burkholderia cepacia* No. 24. *J Appl Glycosci* 53: 7–11. <https://doi.org/10.5458/jag.53.7>
- Murakami H, Kawano J, Yoshizumi H, Nakano H, Kitahata S (2002) Screening of lactobionic acid producing microorganisms. *J Appl Glycosci* 49 (4): 469-477. <https://doi.org/10.5458/jag.49.469>
- Oh YR, Jang YA, Hong SH, Eom GT (2020a) High level production of maltobionic acid from high-maltose corn syrup by genetically engineered *Pseudomonas taetroleans*. *Biotechnol. Reports* 28: e00588. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00558>
- Oh YR, Jang YA, Lee DS, Kim JH, Hong SH, Han JJ, Eom GT (2020b) Enhancement of Lactobionic Acid Productivity by Homologous Expression of Quinoprotein Glucose Dehydrogenase in *Pseudomonas taetrolens*. *J Agric Food Chem* 68: 44, 12336-12344. DOI:10.1021/acs.jafc.0c04246
- Oh YR, Jang YA, Song JK, Eom GT (2022a) Whole cell biocatalysis using genetically modified *Pseudomonas taetrolens* for efficient production of maltobionic acid from pure maltose and high-maltose corn syrup. *Bioprocess Biosyst Eng* 45: 901-909. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02708-w>
- Oh YR, Jang YA, Eom GT (2022b) Valorization of Waste Cooked Rice into Value-Added Maltobionic Acid Using Genetically Engineered *Pseudomonas taetrolens*. *ACS Sustainable Chem Eng* 10 (2): 810-815. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06208>
- Suehiro D, Nishio A, Kawai J, Fukami K, Ohnishi M. (2020) Effects of corn syrup solids containing maltobionic acid (maltobionic acid calcium salt) on bone resorption in healthy Japanese adult women: A randomized double-blind placebo-controlled crossover study. *Food Sci Nutr* 8: 1030-1037. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1387>
- Suehiro D, Moriwaki Y, Fukami K, Abe-Dohmae S, Ohnishi M (2022) The effect of maltobionic acid on bone metabolism markers in healthy Japanese postmenopausal women: A randomized

double-blind placebo-controlled crossover study. Food Sci Nutr 10: 2496-2504.

<https://doi.org/10.1002/fsn3.2855>

Tanabe K, Okuda A, Ken F, Yamanaka N, Nakamura S, Oku T (2020) Metabolic fate of newly developed nondigestible oligosaccharide, maltobionic acid, in rats and humans. Food Sci Nutr 8: 3670-3616. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1643>

Vedovato V, Vanbroekhoven K, Pant D, Helsen J (2020) Electrosynthesis of Biobased Chemicals Using Carbohydrates as a Feedstock. Molecules 25 (16): 3712.

<https://doi.org/10.3390/molecules25163712>

Cellobionic and Lactobionic acids produced by *Bacillus* sp. PDD-3b-6, bacterium isolated from cloud water

Mária Matulová¹, Martine Sancelme², Pierre Amato² and Anne-Marie Delort²

¹Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia
chemmatu@savba.sk, ² Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), UMR6096 CNRS-UCA-Sigma, Clermont-Ferrand, France

Introduction

Aldobionic acids (ABA), lactobionic (LBA), maltobionic (MBA) and cellobionic (CBA) are attractive in different branches of industry due to their interesting properties for numerous applications. Due to their similar structures they have similar physico-chemical properties.

LBA (β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-gluconic acid) takes an important place in food, medicine, cosmetics and chemical industries due to its metal chelating, moisturizing effect, biocompatibility, biodegradability, antioxidant, antimicrobial, and many other properties (Gutiérrez et al. 2012; Alonso et al. 2013). LBA is produced by many bacteria, but the screening for new LBA producing bacterial strains continues (Murakami et al. 2002; Lee et al. 2022, Han et al. 2022). For biotechnological largescale application of LBA production high yields are desirable and thus optimal incubation conditions are searched including genetical engineering methodologies (Alonso et al. 2013, 2017; Sarenkova et al. 2018; Oh et al. 2020a, 2020b, 2022a, 2022b). Some research group deal with optimisation of CBA bioproduction from cheap cellulosic biomass conversion to cellobiose and its subsequent biotransformation to cellobionate (Zhou M et al., 2022; Industrial Crops and Products 2022, 188:115650.). Some bacterial strains, most frequently affiliated with *Pseudomonas*, can directly oxidize lactose and maltose to LBA and MBA, respectively, and then use these sugars as carbon sources (Kluyver et al. 1951). Such reutilization of LBA and MBA as a source of carbon was not observed in *B. cepacia* indicating distinct functioning (Murakami et al. 2002).

Keywords: aldobionic acids, *Bacillus* sp. PDD-3b-6, sugar metabolism, NMR

Material and methods

Already described in Matulova et al. 2011 and Matulova et al. 2014.

Results and Discussion

Bacillus sp. PDD-3b-6, a bacterial strain was isolated from cloud water phase of tropospheric clouds (Genbank accession number DQ512741). It has numerous metabolic properties of interest regarding sugar catabolism, contaminants (Durand et al., 2006), or volatile compounds present in the atmosphere (Husarova et al. 2011). Particular were those observed on sucrose or high concentration of glucose in pure water (Matulova et al. 2011 and Matulova et al. 2014). Study of sugar metabolism revealed further surprising information. The ¹H, COSY and HSQC NMR spectral patterns enabled identification of MBA production in pure water on low concentration of glucose, fructose, maltose, sucrose, turanose and trehalose without any intermediate compound. However, when all substrate was exhausted MBA was further used by bacterium as a source of energy.

The rate of cellobiose biotransformation by *Bacillus* sp. PDD-3b-6 was similar as that of trehalose and maltose and it resulted in the CBA production. CBA was the only metabolite present in its incubation media after 46h (cellobiose was totally consumed by bacterium), and its signal

intensities in NMR spectra (Table 1) gradually decreased. They disappeared after 55 h. Lactose degradation was much slower than maltose and cellobiose. Signals of LBA (Murakami et al. 2002) appeared early (after 4 h), its amount increased slowly and reached a maximum after 22 h of incubation, then it remained constant and gradually disappeared after 55 h. However, LBA never remained the only metabolite in the medium. At the end of the incubation (96 h) only 35% of LB was degraded. These observations indicate that during syntheses of these ABA no cleavage of the interglycosidic linkage takes place.

Table 1 NMR data of CBA in D₂O at 25°C, TSP-d₄, 500MHz.

	Position H/C	1	2	3	4	5	6	6'
Glcβ (1→4)	δ _H	4.62	3.34	3.50	3.40	3.45	3.90	3.72
	δ _C	105.68	76.10	78.23	72.16	76.10	63.27	
GlcA	δ _H	-	4.15	4.08	4.00	3.98	3.85	3.75
	δ _C	180.96	75.07	74.22	84.48	74.47	64.47	

The main structural difference between disaccharide transformed to MBA resides in the reducing end sugar: glucose in maltose and trehalose; fructose in sucrose and turanose. This indicates that different enzymes should be involved into their transformation into a gluconic acid to form MBA. However, the situation is different in trehalose as in its molecule two α-glucose units are C1-C1' interglycosidically linked. Here, anomeric centres are blocked for an oxidation. Free gluconic acid was not identified in the incubation media. Not reducing end sugar in both, lactose and cellobiose, were in β configuration and thus biotransformation led to LBA and CBA respectively.

The sugar metabolism study of *Bacillus* sp. PDD-3b-6 led to surprising information: the capacity of this bacterium to produce MBA on different sugars and CBA on cellobiose in pure water.

Obtained results are of great biotechnological interest because of a simple process of MBA and CBA isolation and purification. Rich enzymatic system of this bacterium is promising for a development of new strategies in biosynthesis of ABA.

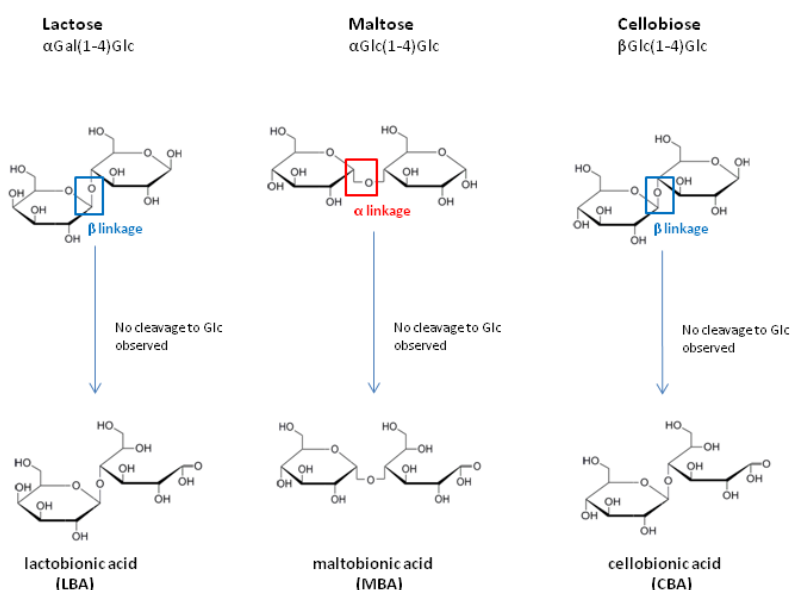


Fig. 1 Disaccharides directly biotransformed to ABA by *Bacillus* sp. PDD-3b-6 in pure water.

Acknowledgements

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Study of structural changes of complex glycoconjugates in the process of inherited metabolic and civilization diseases, ITMS: 313021Y920, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

- Alonso S, Rendueles M, Díaz M (2013) *Biotechnol Adv* 31 (8): 1275-1291.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.010>
- Alonso S, Rendueles M, Díaz M (2017) *Process Biochem* 58: 9-16.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.034>
- Durand, S, Amato, P, Sancelme, M, Delort, AM, Combourieu, B, Besse-Hogan, P (2006) *Lett App Microbiol* 43: (2), 222-228. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01923.x>
- Gutiérrez LF, Hamoudi S, Belkacemi K (2012) *Internat Dairy J* 26: 103-111
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.05.003>
- Han HJ, Oh YR, Eom GT (2022) *ACS Food Sci Technol* 2 (1): 66-74.
<https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00322>
- Husarova S, Vaitilingom M, Deguillaume L, Traikia M, Vinatier V, Sancelme M, Amato P, Matulova M, Delort AM (2011) *Atmos Environ* 45: 6093-6102.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.06.035>
- Kluyver AJ, De Ley J, Rijven A (1951) *Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol* 17: 1-14.
- Lee SS, Oh YR, Jeong BY, Eom GT (2022) *Enz Microb Tech* 153: 109954.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109954>
- Matulová M, Husárová S, Capek,P, Sancelme M, Delort A-M (2011) *Carbohydr Polym* 346: 501-507. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.012>
- Matulová M, Husárová S, Capek P, Sancelme M, Delort A-M (2014) *Environ Sci Technol* 48: 14238–14247. <https://doi.org/10.1021/es501350s>
- Murakami H, Kawano J, Yoshizumi H, Nakano H, Kitahata S (2002) *J Appl Glycosci* 49 (4): 469-477. <https://doi.org/10.5458/jag.49.469>
- Oh YR, Jang YA, Hong SH, Eom GT (2020a) *Biotechnol. Reports* 28: e00588.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00558>
- Oh YR, Jang YA, Lee DS, Kim JH, Hong SH, Han JJ, Eom GT (2020b) *J Agric Food Chem* 68: 44, 12336-12344. DOI:10.1021/acs.jafc.0c04246
- Oh YR, Jang YA, Song JK, Eom GT (2022a) *Bioprocess Biosyst Eng* 45: 901-909.
<https://doi.org/10.1007/s00449-022-02708-w>
- Oh YR, Jang YA, Eom GT (2022b) *ACS Sust Chem Eng* 10 (2): 810-815.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06208>
- Sarenkova I, Ciprovica I (2018) *Res Rural Develop* 1: 233-239.
<https://doi.org/10.22616/rrd.24.2018.037>
- Zhou M, Tao L, Russell P, Britt RD, Kasuga T, Lü X, Fan Z, (2022) *Industr.Crops Prod* 188:115650. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115650>

Monitorovanie hladiny Glc4 u Pompe pacientov pomocou ^1H NMR

Mária Matulová¹, Iveta Uhliariková¹, Anna Šalingová², Anna Hlavatá³

¹Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko; chemmatu@savba.sk

²NÚDCh, Oddelenie laboratórnej medicíny, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovensko

^cDetská klinika, Fakultná nemocnica LF UK a NÚDCh, Limbová 1, 83340 Bratislava, Slovensko

Úvod

Nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia (NMRS) je v súčasnosti jednou z dôležitých kvantitatívnych, kvalitatívnych a zobrazovacích metód, ktorá otvára nové perspektívy v diagnostike známych ale i neznámych dedičných metabolických ochorení. V ^1H NMR spektre telových tekutín sú prítomné signály všetkých metabolitov obsahujúcich protón. Spektrum poskytuje obraz (fingerprint) o ich zastúpení v zmesi a je odrazom ich koncentrácie v čase odberu vzorky. Najčastejšie analyzovaným je moč, pretože jeho odber je najmenej invazívny.

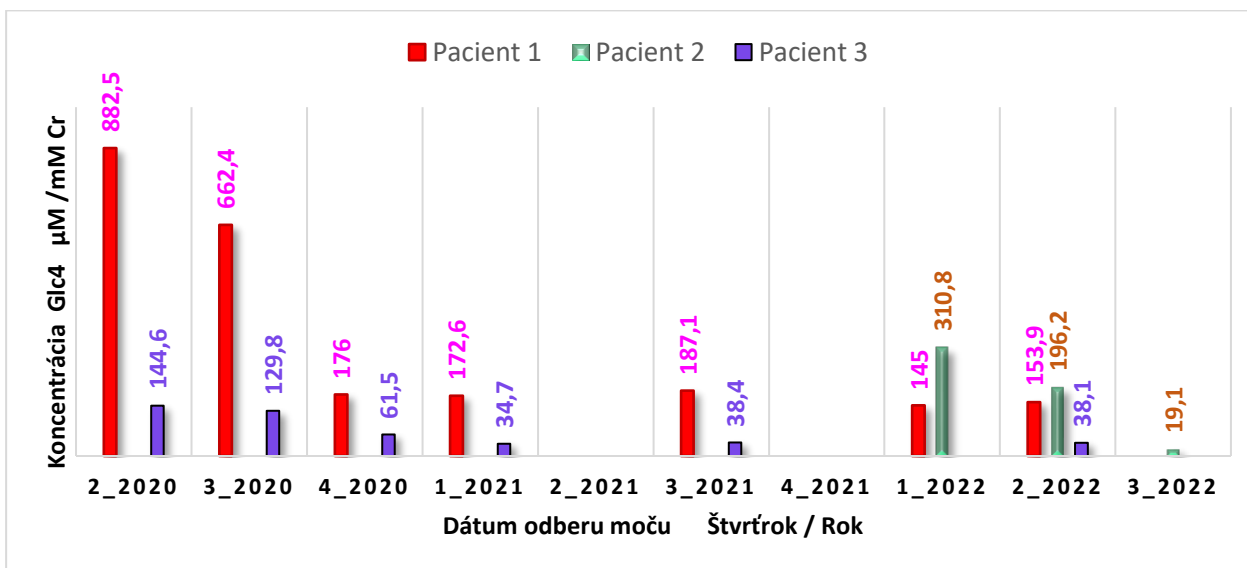
Spolupráca Chemického ústavu SAV s Centrom dedičných metabolických porúch Oddelenia laboratórnej medicíny, NÚDCh v Bratislave prispela k verifikácii a kvantifikácii biomarkerov v moči u pacientov s rôznymi zriedkavými ochoreniami. NMR spektroskopia zohráva dôležitú úlohu v diagnostike niektorých dedičných metabolických ochorení. Metóda je nedeštruktívna, rýchla, nevyžaduje špeciálnu úpravu vzorky a možno ju považovať za alternatívny analytický postup. Okrem identifikácie prítomnosti biomarkera umožňuje aj stanovenie jeho množstva. Z tohto dôvodu je v súčasnosti prakticky používaná na stanovenie koncentrácií špecifického biomarkera Glc4 (glukózového tetrasacharidu) v moči pacientov s Pompe ochorením ([Pakanová 2016, 2017 a 2019](#)). Analýzy vzoriek moču sa robia priebežne podľa potrieb lekárov u pacientov s podozrením na toto ochorenie, alebo u pacientov podstupujúcich enzymatickú substitučnú liečbu (ERT). Do komplexného zhodnotenia úspešnosti ERT vstupuje okrem klinického stavu pacienta mnoho ďalších faktorov, ku ktorým patrí aj stanovenie hladiny Glc4.

Materiál a metódy

Vzorky moču anonymných pacientov boli po odbere skladované pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozmrazené tesne pred NMR analýzou; centrifugované pri 13000 g po dobu 5 minút. Zlyofilizovaný supernatant moču (150 μl) bol rozpustený vo fosfátovom pufrí pH 7.4 (230 μl) obsahujúceho 0.9 mM DSS- d_6 (3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- d_6 sodium salt) ako interný štandard. ^1H NMR spektrá boli merané pri teplote $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 3-mm kyvete na 600MHz spektrometri Bruker AVANCE III HDX 600 MHz vybavenom inverznou kryo sondou CryoProbe TCI H-C/N-D-05-Z. Signál vody bol potlačený presaturáciou sekvenciou *presat*. Koncentrácia Glc4 bola vypočítaná relatívne vzhľadom na intenzitu signálu štandardu.

Výsledky a diskusia

Pre Pompe ochorenie sa na vyhodnotenie koncentrácie špecifického tetrasacharidu Glc4 využíva relatívne dobre rozlíšený H1 anomérny signál terminálnej 1,6-viazanej glukózovej jednotky s chemickým posunom δ 4.957 ppm. Koncentrácia Glc4 je závislá od veku pacienta; najvyššia je pri infantilnej forme, nižšia je pri juvenilnej forme Pompeho ochorenia a najnižšia je u dospelých jedincov (adultná forma). K vyhodnoteniu odozvy pacienta na ERT liečbu prispieva aj informácia o exkrécii Glc4. Tú je možné stanoviť zatiaľ len ^1H NMR spektroskopiou. Obr. 1 ukazuje vývoj stanovených Glc4 koncentrácií u vybraných pacientov.



Obr.1: Vývoj koncentrácií Glc4 v moči pacientov s ochorením Pompe.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

Pakanová Z., Matulová M., Behúlová D., Šalingová A., Hlavatá A., Pätoprstý V., Mucha J. (2016) Molecular diagnosis of Pompe disease using MALDI TOF/TOF and ^1H NMR. *Chemical Papers* 70 (3), 265–271. DOI: 10.1515/chempap-2015-0218.

Pakanová Z., Matulová M., Pätoprstý V., Šalingová A., Behúlová D., Hlavatá A., Juríčková K., Mucha J. (2017) Diagnostika a monitorovanie účinnosti terapie Pompeho ochorenia s využitím hmotnostnej spektrometrie a ^1H NMR. 6. Slovenská konferencia o zriedkavých chorobách, 9. novembra 2017, Bratislava. *Via Practica* 14(S2): 35-36. Abstrakt v Supplemente 2 časopisu *Via Practica* (ISSN 1336-930x).

Pakanová Z., Matulová M., Uhliariková I., Behúlová D., Šalingová A., Hlavatá A., Juríčková K., Nemčovič M., Pätoprstý V., Mucha J. (2019) Case study: Monitoring of Glc4 tetrasaccharide in urine of Pompe patients, use of MALDI-TOF-MS, and ^1H NMR. In *Chemical Papers*, 73, no.3, p.701-711. DOI: 10.1007/s11696-018-0623-3

N-glykoprolíácia fibroblastov pre štúdium zmien v ľudskom glykóme

Rebeka Kodríková, Maroš Krchňák, Filip Květoň, Zuzana Pakanová, Peter Baráth, Ján Mucha,
Marek Nemčovič

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9,
841 04 Bratislava, Slovenská republika; chemrkod@savba.sk*

Úvod

Všetky bunky organizmu obsahujú vo svojej štruktúre oligosacharidové zložky – glykány, podieľajúce sa na mnohých kľúčových biologických procesoch (ochrana, bunková komunikácia, diferenciácia, štruktúrna funkcia, imunitné reakcie). Zastúpenie celkových glykánov (glykóm) buniek sa mení v závislosti od stavu organizmu, ktorý môže byť ovplyvnený množstvom faktorov, ako je vek a starnutie organizmu, rôzne ochorenia (napr. diabetu mellitus, a rakovina), zápalové reakcie a pod. [1]. Pre sledovanie zmien v glykóme sme zvolili mezenchymálne bunky – fibroblasty, ktoré sú esenciálnou súčasťou spojivových tkanív a orgánov. Vďaka produkcii tropokolagénu (prekurzor kolagénu) zohrávajú dôležitú funkciu najmä pri fyziologickej reparácii tkanív a regenerácii kože [2]. Pozorovanie zmien v štruktúre glykánov buniek organizmov môže umožniť bližšie pochopenie funkcií glykómu pri jednotlivých ochoreniach, v našom prípade pri vrodených poruchách glykozylácie, ale aj pri stresových a imunitných reakciách organizmu [3].

V práci prezentujeme optimalizáciu výberu vhodnej metódy pre lýzu buniek a následnú izoláciu glykánov z fibroblastov. Na identifikáciu glykánových štruktúr získaných z fibroblastov bola využitá hmotnostná spektrometria MALDI-TOF MS.

Výsledkom práce je optimalizovaný protokol pre izoláciu glykánov z fibroblastov, ktorý bude ďalej využívaný pre štúdium zmien glykómu v spojení s vrodenými poruchami glykozylácie.

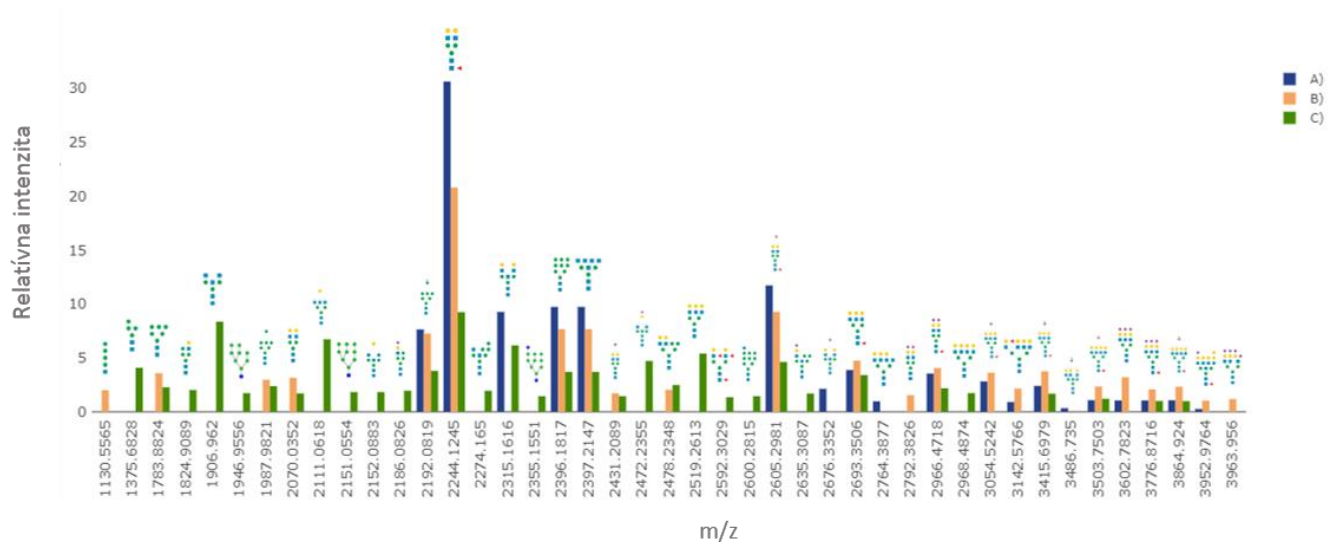
Materiál a metódy

Na lýzu buniek a získanie glykoproteínov z fibroblastov boli využité tri metódy:

- A) využitie denaturačných vlastností močoviny (10 mM urea/HEPES, pH 7,4),
- B) sonikácia v hypotonickom prostredí (20 mM HEPES-KOH, 0,25M sacharóza, pH 7,4),
- C) dezintegrácia bunkovej membrány mrazom v deglykozylačnom pufri (10 mM Tris-HCl, pH 7,5).

N-glykány boli vo všetkých troch prípadoch získané enzymatickým štiepením (PNGáza F) glykoproteínov fibroblastov, pričom boli následne od iných biomakromolekúl separované na SPE kolónkach a modifikované permetyláciou na stabilizáciu N-glykánov. Na identifikáciu glykánových štruktúr bol použitý MALDI-TOF/TOF hmotnostný spektrometer Bruker UltrafleXtreme. Výsledky boli vyhodnotené v programe vyvíjanom na oddelení glykobiológie SAV – matchMass.

Výsledky a diskusia



Obr. 1: Porovnanie metód izolácie na základe zastúpenia glykánov získaných danou metódou.

Izolácia glykánov pomocou A) denaturačných vlastností močoviny B) sonikácie C) zmrazenia.

Pri optimalizácii metód pre lýzu fibroblastov a izoláciu glykánov nás zaujímalo predovšetkým spektrum (vysokomanóзовé, komplexné a sialované glykány) a množstvo detegovaných glykánov, ktoré sa pri jednotlivých metódach líšili. Celkovo sme identifikovali 43 rôznych glykánových štruktúr. V prípade využitia močoviny ako denaturačného činidla na lýzu buniek sa nám podarilo identifikovať najmenšie spektrum (18) glykánových štruktúr, zatiaľ čo pri využití sonikácie (mechanickom rozbití buniek), bol identifikovaný väčší počet glykánov – 23, s vyššou variabilitou. Najširšiu škálu a množstvo (33) glykánových štruktúr sme detegovali pri použití dezintegrácie bunkových membrán mrazom.

Na základe získaných výsledkov sa ako najvhodnejšia metóda ukázala lýza fibroblastov prostredníctvom narušenia bunkových membrán mrazom. Touto metódou sa nám podarilo získať nielen najvyšší počet glykánov, no tiež najširšie spektrum glykánov – od vysokomanóзовých po komplexné sialované glykány, ktorých zastúpenie bolo pri zvyšných dvoch metódach nižšie.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4, APVV-18-0336, a grantom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Dotz, V., & Wuhrer, M. (2019). N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS letters*, 593(21), 2966–2976.
- [2] Alberts, B. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). W.W. Norton & Company.
- [3] Dick, M. K., Miao, J. H., & Limaem, F. (2022). *Histology, Fibroblast*. In StatPearls. StatPearls Publishing

Monitoring zmien hladín glykobiomarkerov alfa-manozidózy pomocou HPLC-FLD

Maroš Krchňák¹, Rebeka Kodríková¹, Marek Nemčovič¹, Ján Mucha¹, Zuzana Pakanová¹

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemkrma@savba.sk*

Úvod

Alfa-manozidóza (AM) je ultravzácne lyzozómové ochorenie s autozómovo recesívnou dedičnosťou. Odhadovaná prevalencia je 1:500000 až 1:1000000. Príčinou ochorenia je znížená enzýmová aktivita lyzozómovej α -manozidázy (EC 3.2.1.24) v dôsledku heterogénnych mutácií v *MAN2B1* géne. α -manozidáza v lyzozómoch katalyzuje hydrolyzu manozidových väzieb v degradačnej dráhe N-viazaných oligosacharidov glykoproteínov. Medzi klinické príznaky patria poruchy sluchu, mentálna zaostalosť, imunodeficiencia a znížené motorické funkcie [1, 2]. Nedegradované vysokomanóзовé oligosacharidy (Man2-GlcNAc – Man9-GlcNAc) sa akumulujú vo všetkých tkanivách a sú detegovateľné v moči alebo krvnom sére, napr. tenkovrstvovou chromatografiou (TLC), vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) alebo hmotnostnou spektrometriou (MS) [1, 3, 4].

Cieľom práce bola kvantifikácia špecifických oligosacharidových biomarkerov alfa-manozidózy v moči štyroch pacientov a určenie zmeny ich hladín medzi jednotlivými odbermi.

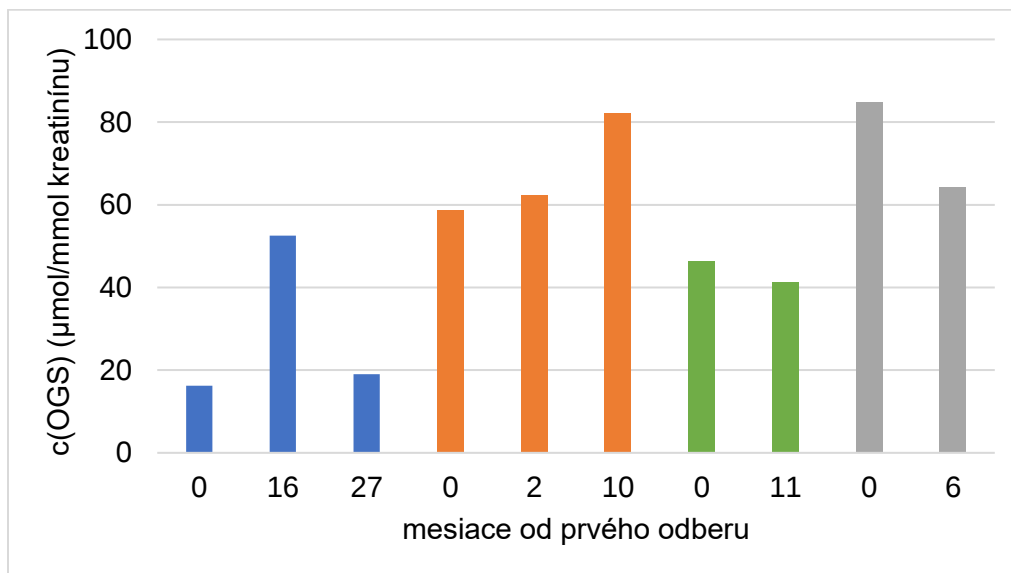
Materiál a metódy

Ekvivalent moču obsahujúci 10 μg kreatinínu bol zriedený ultračistou vodou na 1 ml. Vzorky boli následne prečistené pomocou kolón pre extrakciu na pevnej fáze (SPE) Supelclean LC-18 a následne Supelclean ENVI-Carb PGC. Eluát z kolón bol vysušený vo vákuovom centrifugačnom koncentrátore. Oligosacharidy boli fluorescenčne označené 2-aminobenzamidom (2-AB) 5 μl zmesi 5 mg 2-AB, 30 μl ľadovej kyseliny octovej, 70 μl dimetylsulfoxidu (DMSO) a 6 mg kyanobórohydridu sodného. Po trojhodinovej inkubácii pri 65°C boli vzorky zbavené nadbytočnej značky pomocou HILIC SPE platne Strata NH₂ (55 μm , 70 Å, 50 mg). Eluát bol vysušený vo vákuovom centrifugačnom koncentrátore a rozpustený v 100 μl ultračistej vody.

Oligosacharidy boli kvantifikované použitím HPLC (Thermo Accela; Thermo Fisher Scientific, USA) s fluorescenčnou detekciou (Dionex UltiMate 3100; Thermo Fisher Scientific, USA) podľa Hanić et al. [5] pri teplote 60°C, excitačnej vlnovej dĺžke 250 nm a emisnej vlnovej dĺžke 430 nm. Použitá bola gradientová elúcia dvoch mobilných fáz: MF A: acetonitril, MF B: 100 mmol·dm⁻³ mravčan amónny (pH 4,0). Oligosacharidy boli kvantifikované podľa plôch príslušných pík na základe kalibračných kriviek 2-AB značenej maltotetraózy a maltohexózy v rozsahu 5-250 nmol·dm⁻³ pomocou softvéru Chromeleon 7.2.10 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Výsledky a diskusia

Vo všetkých vzorkách boli pomocou HPLC-FLD detegované a kvantifikované charakteristické oligosacharidy Man2GlcNAc-Man9GlcNAc a vyjadrené ako súčet ich koncentrácií v μmol oligosacharidov/ mmol kreatinínu (Obr. 1). Profil oligosacharidov, ako aj ich hladiny sú v súlade s publikovanou literatúrou [6, 7, 8]. Vo vzorkách všetkých pacientov boli detegované zmeny v čase. U dvoch pacientov klesla hladina celkových oligosacharidov, u jedného pacienta hladina postupne rástla a jednému pacientovi prudko vzrástla a následne poklesla koncentrácia oligosacharidov. Použitá metóda môže byť aplikovaná pri monitoringu priebehu alfa-manozidózy, nakoľko hladiny oligosacharidov reflektujú klinický stav pacienta a závažnosť ochorenia [9].



Obr.1: Zmeny v hladinách celkových vysokomanózových oligosacharidov v moči pacientov. Vzorky pacientov sú odlišené farebne.

Pod'akovanie

Táto publikácia bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4 a grantom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Ceccarini M.R., Codini M., Conte C., et al. (2018) Int. J. Mol. Sci. 19(5), p. 1500
- [2] Malm D., Nilssen Ø. (2008) Orphanet J. Rare Dis. 3(1):21
- [3] Semeraro M., Sacchetti E., Deodato F., et al. (2021) Orphanet J. Rare Dis. 16(1), p. 24
- [4] Casado M., Ferrer-López I., Ruiz-Sala P., et al. (2017) Rev. Anal. Chem. 36(3), p. 20160019
- [5] Hanić M., Lauc G., Trbojević-Akmačić I. (2019) Curr. Protoc. Protein Sci. 97(1), e95
- [6] Xia B., Asif G., Arthur L., et al. (2013) Clin. Chem. 59(9), p. 1357
- [7] Borgwardt L., Dali C.I. et al. (2013) J. Inherit. Metab. Dis. 36(6):1015-1024.
- [8] Bruggink, C., Poorthuis, B.J.H.M. et al. (2012) Anal. Bioanal. Chem. 403, 1671–1683.
- [9] Beck, M., Olsen, K.J. et al. (2013) Orphanet J. Rare Dis. 8(1), p. 88.

Influence of silver incorporation on chemical bonding in plasma polymerized hexamethyldisiloxane based metal/polymer nanocomposite films

Vitalii Izai^a, Tomáš Fiantok^a, Tomáš Roch^b, Štefan Nagy^c, M. Pop^d, Peter Kúš^b, Marian Mikula^{b,c}

^aDetached Workplace of Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University in Bratislava, Sadová, 1148 Turany, Slovakia, E-mail address: vitalii.izai@fmph.uniba.sk

^bDepartment of Experimental Physics, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University in Bratislava, Mlynská Dolina F2, 842 48 Bratislava, Slovakia

^cInstitute of Materials and Machine Mechanics SAS, Dúbravská cesta 9, 845 11 Bratislava, Slovakia

^dDepartment of Applied Physics, Faculty of Physics, Uzhhorod National University, Voloshyna 54, Uzhhorod, Ukraine

Silver-containing nanocomposite thin-films were deposited using the High Target Utilization Sputtering technique (HiTUS) by simultaneous sputtering of Ag target and polymerization of hexamethyldisiloxane (HMDSO) vapors in radiofrequency plasma. The presence of silver in form of nanoclusters was confirmed by X-ray diffraction and transmission electron microscopy. The silver content in the films under investigation decreases with increasing HMDSO monomer partial pressure. Addition of silver leads to a steep decrease of organosilicon polymer density, decrease of bonded carbon content and increase of oxygen content bonded in silanol groups (SiOH). The increase of silver content leads to more intensive fragmentation of polymer chains and changes the Si-O-Si backbone of polymer matrix from suboxide structure typical for organosilicon polymers towards nanoporous inorganic silicon oxide cage structure. Silver incorporation changes the plasma polymerized HMDSO the same way as transition from “soft” to “hard” plasma conditions.

INTRODUCTION

Silver nanoparticles (AgNPs) exhibit significant bactericidal, bacteriostatic, antiviral, and antifungal action on various pathogenic microorganisms, yeast fungi, and viruses thanks to the Ag⁺ ions released in the media from the large specific surface area of nanoparticles [1]. However, passivation of nanoparticles' surface can be observed in natural environments even in the case of AgNPs because of the presence of HS⁻ and halide ions that create an insoluble sulfide Ag₂S and a silver halide shell, which limits further dissolution of silver through conventional route [2], [3]. As a result, antibacterial properties of AgNPs degrade, and biofilms can develop on their surface. On the other hand, the metallic silver demonstrates weak mechanical properties, such as low hardness and poor adhesion to most surfaces. The adhesion issues of AgNPs in free form prepared by various technologies are even more evident. Thus, AgNPs by themselves cannot be considered as a self-sustaining functional coating. On the other hand, hard plasma polymers, including plasma polymerized organosilicon compounds, have been recognized for several decades for their unique properties, biocompatibility and widespread use in modern biomedical applications [4]. They exhibit strong adhesion to various surfaces, including flexible organic materials, and can serve simultaneously as a supporting amorphous matrix for metal NPs and as a functional barrier for adjusting the silver ion release. The potential of RF plasma polymerized hexamethyldisiloxane (HMDSO) as a barrier for adjusting the silver ion release from AgNPs was studied in detail by N. Alissawi et al. [5]. The first silver-containing plasma polymer composite films prepared in a one-step continuous process were reported by H. Biederman et al. [6]. N-hexane was used as a precursor for the amorphous a-C:H matrix and an unbalanced DC magnetron with a metallic silver target as an Ag source. P. Hlíděk et al. studied composite Ag/C:H:N films deposited by means of an unbalanced magnetron operated in a gas mixture of nitrogen and n-hexane and controlled the surface properties of the resulting films by varying the nitrogen content [7]. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used for detail study of chemical bonding and ageing effects in nitrogen doped amorphous carbon matrix a-C:H:N. Saulou et al. prepared composite thin films containing silver nanoclusters embedded in an organosilicon matrix by means of plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) onto stainless steel in order to prevent microbial adhesion by combining the anti-adhesive potential of the organic matrix with the broad-spectrum antimicrobial properties of silver. This was assumed to be related to Ag⁺ progressive release from the embedded nanoparticles into the surrounding medium and was confirmed by ICP-MS measurements [8]. The authors presented a brief study of Ag incorporation influence on the chemical bonding in organosilicon amorphous matrix by FTIR and reported silver favored methyl incorporation in the film network. The similar study of Ag-DLC nanocomposite films prepared by dual-targets HiPIMS was published recently by Wang et al. [9].

Grill and Neumayer presented a detailed study of structure and chemical bonding in plasma polymerized tetramethylcyclotetrasiloxane films with various content of organic carbon using FTIR [10]. Dakroub et al. used FTIR technique to study the influence of discharge power to HMDSO vapor flow rate ratio on the structure of plasma polymerized HMDSO (pp-HMDSO). In the current paper we present a deeper view into the chemical bonding in organosilicon polymer matrix of Ag containing nanocomposites obtained by High Target Utilization Sputtering (HiTUS).

EXPERIMENTAL

Silver-containing plasma polymerized organosilicon nanocomposite films were deposited using novel sputter deposition technique HiTUS (High Target Utilization Sputtering) on c-cut sapphire and single crystal Si wafer substrates in PQL (Plasma Quest Limited) S500 laboratory coater equipped with MKS RPG-50 pulsed DC power supply for target biasing and MKS elite 600 RF Plasma Generator for substrate biasing. Combination of pulsed DC target bias with remotely generated dense RF ICP plasma ensures stable deposition process with minimal target poisoning and arcing while depositing the non-conductive plasma polymerized coatings. HMDSO (hexamethyldisiloxane) monomer used as a precursor for organosilicon amorphous matrix was introduced from preheated stainless steel flask through heated Pfeiffer UDV 040 gas dosing valve. The HMDSO vapor pressure in the deposition chamber was manually regulated to maintain the stable total pressure monitored by MKS Baratron capacitive gauge. The deposition chamber was evacuated to base pressure below 3×10^{-3} Pa before the deposition. The substrates were plasma etched before deposition with 300 W of RF power applied to substrate holder during 5 min. period. No additional heating of substrates was performed. The temperature of substrates increased above 120 C during this step and was self-maintained around 100 C from plasma heating during the following deposition process. The deposition time was set to 10 min.

Tescan Vega SEM equipped with Oxford Instruments INCAx-act EDS analyzer was used for measurement of the deposited films chemical composition. The samples for TEM investigation were prepared by short deposition of the thin films with thickness around 20 nm on the TEM-LC200CUCC continuous ultrathin carbon film coated copper grids. No plasma etching was applied before the deposition. Instead, the copper grids were preheated to 100 C to achieve the deposition conditions of the thicker samples. Microstructural investigations were performed with a probe-corrected FEI/ThermoFisher Scientific Titan Themis 300 transmission electron microscope in scanning mode (STEM) at a 200 kV accelerating voltage equipped with an EDS system (Super-X). The probe convergence angle was set to 17.5 mrad for imaging applications. Scanning micrographs were acquired simultaneously by 3 detectors: DF2, DF4, HAADF. X-ray diffraction measurements were performed using PANalytical X'Pert PRO diffractometer with copper anode in symmetrical Bragg-Brentano and in grazing incidence configurations. For X-ray reflectivity configuration we have utilized parabolic X-ray mirror providing quasi parallel narrow primary beam and narrow slits between sample and detector. Williamson-Hall method was utilized to determine the average size of silver nanoclusters.

FTIR spectra were collected using Shimadzu IR Tracer-100 FTIR single beam spectrophotometer in transmission mode at room temperature in the range from 350 to 7900 cm^{-1} with a 4 cm^{-1} resolution and 45 scans. Both sample types deposited on sapphire and Si substrates were measured to cover the maximal spectral range. Additional thick films were deposited on the single crystal Si substrates to investigate the small absorption peaks. The deposition time was fixed to 60 min. that lead to 10-14 μm thick films. The substrate background was subtracted from spectra during measurement in native spectrometer software. Collected spectra were processed in Fityk software.[11] The absorbance was corrected by the films sickness.

RESULTS AND DISCUSSION

The chemical composition of the films under investigation was varied in a wide range by changing the HMDSO monomer partial pressure (p_{HMDSO}) in the deposition chamber while power applied to Ag target was fixed at 500 W. Ag-free reference organosilicon polymer film was obtained at $p_{\text{HMDSO}} = 0.2$ Pa and zero target power. The concentration of silver in the deposited nanocomposite films decreases with HMDSO pressure increasing while the deposition rate nonlinearly increases. Carbon and oxygen content in the organosilicon polymer matrix increases with Ag content increasing. The similar but steeper increase of carbon content is observed in Ag-free films prepared at the same values of HMDSO pressure. Ag incorporation leads to a shift of carbon curve to the lower values and decrease of its steepness. Thus, the decrease of carbon content can be concluded as a pure effect of silver incorporation while increase of carbon content with increasing Ag concentration is caused rather by change of monomer partial pressure.

XRD studies indicate that the silver present in form of metallic nanoclusters. Transmission electron microscopy confirms the 2-phase nanostructure of the deposited thin-film nanocomposites based on Ag nanoclusters embedded into amorphous plasma polymerized hexamethyldisiloxane (pp-HMDSO). The size of Ag nanoclusters evaluated from XRD increases with silver content increasing as well as the density of films obtained from XRR measurements. At the same time the density of organosilicon polymer matrix calculated from weight concentration of silver, XRR density, and metallic silver density decreases with increasing silver concentration. The decrease of polymer matrix density caused by silver incorporation is much steeper comparing with the decrease of XRR density of Ag-free pp-HMDSO films obtained at the same values of HMDSO partial pressure in the deposition chamber.

To obtain additional information about structure features and chemical bonding in amorphous polymer matrix FTIR spectroscopy was utilized which is especially effective tool for analysis of organic plasma deposits. IR absorption spectra are severely distorted with interference fringes and strong background associated with scattering on Ag nanoclusters. While the interference fringes, observed mainly on the spectra of films on the silicon substrates, are suppressed with increase of silver content especially in the short-wavelength range of the spectrum, the increase of absorption background caused by scattering increases with wavenumber increase until saturation level defined by the limited dynamical range of the spectrometer. Before deconvolution of peaks the interference fringes should be removed from the analyzed spectra and baseline correction should be performed. Approach published in [12] was used for this purpose. As can be noticed, the half-sine shaped measurement artifacts can be still observed in the featureless regions due to possible deviations of refractive index (

Fig. 1). Assignment of peaks was done according to [10], [13] where are summarized results from numerous publications dedicated to FTIR spectroscopy of organosilicon polymers. In case of large deviation of peak position additional comparison was done with data from [14], [15].

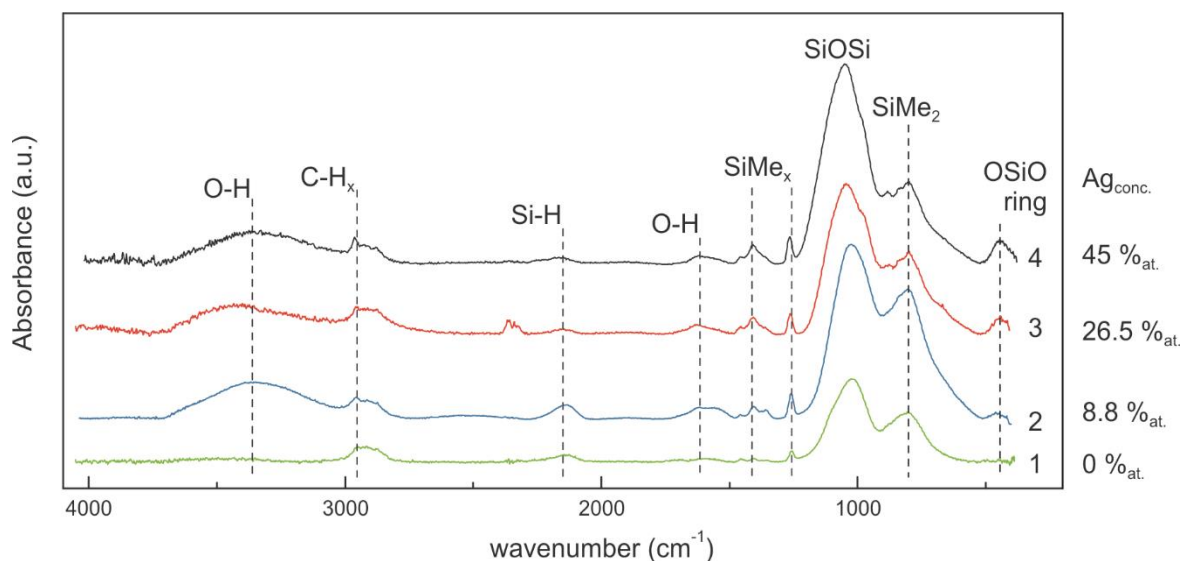


Fig. 1. FTIR absorption spectra of pp-HMDSO (1), Ag6 (2), Ag1 (3) and Ag5 (4) films deposited onto single crystal silicon substrates after interference fringes and baseline removed.

Wide absorption band between 3000 and 3700 cm^{-1} is attributed to O-H stretching in silanol groups (SiOH) as well as absorbed molecular water [16]. Its asymmetric shape needs fitting at least by 2 Gaussians. It is followed by weaker absorption feature in the range of 1500-1750 cm^{-1} associated with bending in H_2O usually observed at $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ [16]. The last one is rather affected by change of monomer vapor pressure in deposition chamber than addition of silver itself as can be seen from Fig.2.

At the same time, a drastic increase of O-H stretching band is observed during increase of Ag concentration with maximum at 40 %_{at.} It doesn't correlate with intensity of absorbed molecular water bending mode and can lead us to assumption about formation of hydroxyl termination groups, hypothetically, on the surface of silver nanoclusters during growth of the film. This correlates well with Ag promoted increase of oxygen content in the studied films. Absorption band between 2800 and 3000 cm^{-1} is attributed to stretching vibrations in CH_x groups and can be deconvoluted into 4 modes corresponding to symmetric and antisymmetric stretching in CH_3 and CH_2 [10], [13]. In films under investigation this peak is located on the tail of O-H stretching absorption band and its shape can be severely affected by this superposition. Thus, the precision of its deconvolution is poor except antisymmetric stretching mode in CH_3 and only total area under this peak is analyzed in current study. The contribution of antisymmetric stretching mode in CH_3 in CH_x absorption band is increased with increase of silver content (Fig.3). This can indicate on higher saturation of carbon termination groups with addition of silver even when film is grown in "harder" plasma conditions with increased W/F ratio.

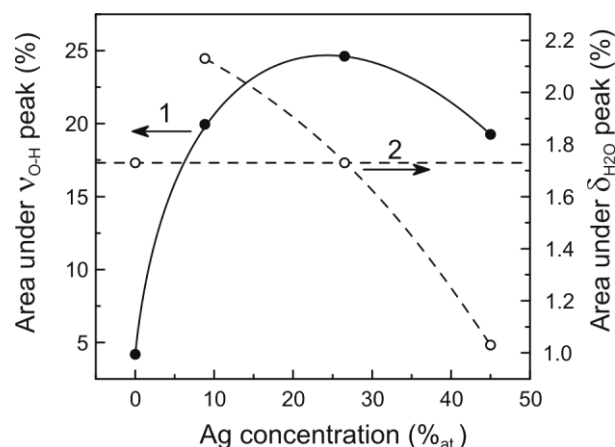


Fig. 2. Peak area of O-H stretching band (1) and H₂O bending band (2) vs. Ag concentration.

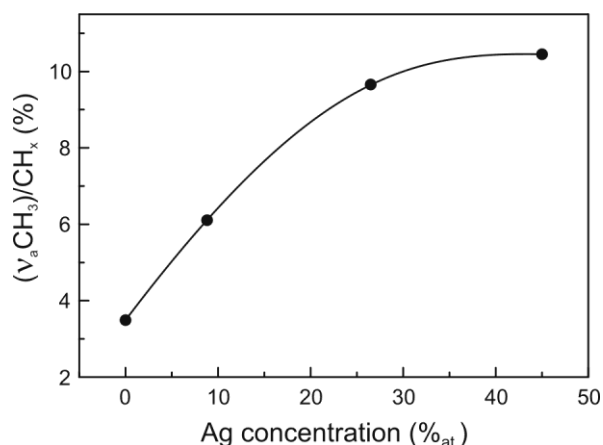


Fig. 3. Contribution of antisymmetric stretching mode in CH₃ in CH_x absorption band vs. Ag concentration.

Absorption band observed between 2100 and 2300 cm⁻¹ is attributed to the Si-H symmetric stretching in various Si environments (H-SiO₃, H-SiO₂Si, H-SiOSi) [10]. Addition of silver leads to rearrangement of observed modes and their peak intensities. While in pure pp-HMDSO reference film H-SiO₂Si mode is dominant and accompanied with 2 times weaker H-SiOSi mode, the addition of silver leads to increase of H-SiOSi mode contribution and disappearing of H-SiO₂Si at 40%at. of Ag. But Ag₅ film deposited at $p_{\text{HMDSO}} = 1$ Pa demonstrate appearance of H-SiO₂Si mode and even H-SiO₃ additionally. Peak at ~1455 cm⁻¹ indicates on presence of CH₂ groups isolated from Si atoms but without any essential changes due to Ag incorporation. Absorption band at ~1406 cm⁻¹ corresponds to antisymmetric bending of C-H₃ in methyl terminated SiMe_x. Peak at ~1362 cm⁻¹ is attributed to bending of C-H₂ in Si-CH₂-Si crosslinks. A slight increase of its intensity is observed with addition of silver. A shift to higher wavenumbers is caused rather due to decrease of monomer vapor pressure at constant discharge power and can indicate on more dense films with additional compressive stress. It is worth noting that the last 3 peak mentioned above are located close to each other and are more overlapped with increase of Ag content. Peak corresponding to the symmetric bending of C-H₃ in SiMe_x groups observed at ~1263 cm⁻¹ [10], [13] exhibits a slight shift to higher wavenumbers with increase of Ag concentration. Together with appearance of absorption peak at ~843 cm⁻¹ related to antisymmetric rocking of CH₃ in SiMe₃ and decrease of absorption peak at ~806 cm⁻¹ attributed to antisymmetric rocking of CH₃ in SiMe₂ it can indicate on decrease of SiMe₂ and increase of SiMe₃ simultaneously with increase of silver content in the studied films. A wide region of strong absorption observed between 1240 and 520 cm⁻¹ is composed from Si-O-Si peak (1000-1200 cm⁻¹), H-Si-O bond bending at ~886 cm⁻¹, antisymmetric rocking of CH₃ in SiMe₃ at ~843 cm⁻¹ and antisymmetric rocking of CH₃ in SiMe₂ at ~806 cm⁻¹, symmetric stretching vibrations in Si-O-Si groups of the SiO network at ~700 cm⁻¹ [14], [15]. Its intensity increases with addition of silver but decreases with monomer vapor pressure decrease. In addition, an intense absorption band observed at ~970 cm⁻¹ in Ag₁ film is attributed to symmetric stretching of Si-O-C bonds [13]. It shifts to higher wavenumbers and increases its intensity with increase of Ag concentration or decrease of monomer vapor pressure alternatively. As this absorption band isn't observed in spectra of films with lower Ag concentration and in Ag-free film, it becomes impossible to distinguish the effect of silver incorporation and monomer vapor pressure change on Si-O-C bonds. The major contribution to peak at ~886 cm⁻¹ in the studied films can be attributed only to H-Si-O bond bending in which each silicon atom has three oxygen neighbors [10].

Si-O-Si band can be fitted using 3 main peaks that are attributed to antisymmetric stretching of Si-O-Si bond at different bonding angles. Peak at 1150-1160 cm⁻¹ is attributed to larger angle Si-O-Si bonds in a cage structure with a bond angle of approximately 150° [10]. It appears at 40%at. concentration of silver and increases with its increase. Peak between 1100 and 1050 cm⁻¹ is assigned to network structure of silicon oxide with bonding angle ~144°. In fully relaxed high-temperature stoichiometric silicon oxide it is observed at 1080 cm⁻¹ and shifts to lower stretching frequencies in low-temperature silicon oxides [17] and organosilicon plasma polymers [10]. Peak located in range 1000-1040 cm⁻¹ is attributed to antisymmetric stretching of Si-O-Si bonds in silicon suboxide structure with bonding angle <144° [17], [18]. Shift of Si-O-Si peak components to higher wavenumbers together with appearance of peak corresponding to vibrations in cage structure is observed with silver content increase. The contribution of each component (cage, network, suboxide) with silver content increase is present in Fig.4.

The contribution of suboxide component decreases with addition of silver and decrease of monomer vapor pressure as well while contributions of network and cage structure components increase. The effects of silver incorporation and HMDSO vapor pressure decrease can be easily distinguished on the concentration curves of suboxide and network

components as reference Ag-free film is obtained at the same monomer vapor pressure as film with 40%_{at.} of silver. The influence of monomer vapor pressure has more significant effect than addition of silver but changes are similar. Thus, addition of silver changes the Si-O-Si skeleton from suboxide towards silicon oxide cage structure the same way as transition from “soft” to “hard” plasma conditions. The transition from suboxide to network and cage structure is also confirmed by increase of oxygen content. The decrease of polymer matrix density can be caused by nanopores typical for cage structure.

The ratio of total area under SiMe peaks to total area under Si-O-Si peaks decreases with silver content increase as well as with decrease of monomer vapor pressure (Fig.5) indicating the decrease of bonded carbon. Together with increase of total carbon content observed in EDS spectra it can be an evidence of unbonded amorphous carbon present in the polymer with decreasing HMDSO pressure as a result of hydrogen loss in CH_x species in plasma and graphitization. At the same time contribution of SiMe₃ termination groups increases with increase of silver content and decrease of monomer vapor pressure the similar way as reported by Saulou et al. [8]. This can be an evidence of increased HMDSO molecule fragmentation in plasma and crosslinking in the resulting organosilicon polymer matrix caused by addition of metal silver during films growth. Thus, addition of silver changes the organosilicon polymer matrix from soft PDMS-like plasma polymer to “harder” plasma polymer with structure peculiarities more typical for inorganic non-stoichiometric SiO_x films.

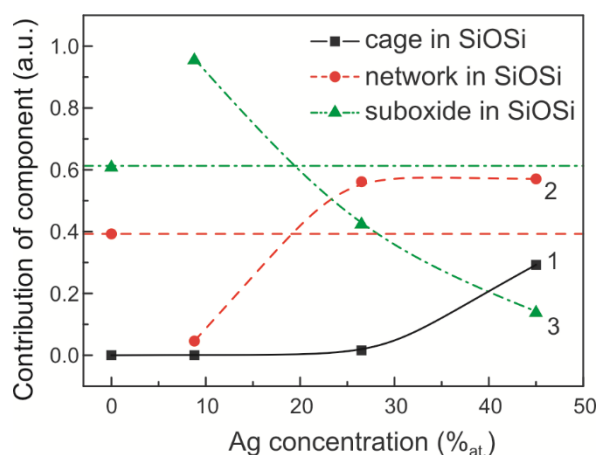


Fig. 4. Contribution of cage (1), network (2) and suboxide (3) components into Si-O-Si absorption band vs. Ag concentration.

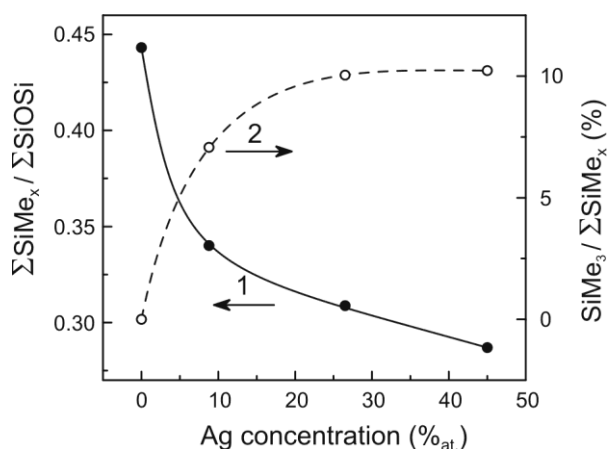


Fig. 5. Ratio of SiMe to SiOSi area (1) and contribution of SiMe₃ in total SiMe environments (2) vs. Ag concentration.

The small peak at the long-wavelength edge of the FTIR spectrometer range between 440 and 460 cm⁻¹ associated with bending of O-Si-O structural units and ring opening vibrations [10] is increased with increase of silver content and decrease of HMDSO vapor pressure as well. Thus, addition of silver acts the same way as decrease of monomer vapor pressure and leads to increased formation of -Si-O-Si-O- rings in the structure of organosilicon polymer matrix. Additionally, observed peak demonstrates red shift with Ag concentration increase that is the evidence of vibration frequency decrease caused by decrease of O-Si-O angle in ring structures due to decrease of rings average length. At the same time, FWHM of the observed peak is decreased with addition of silver but further increase is observed together with decrease of monomer vapor pressure. Thus, transition to “hard” plasma conditions leads to larger variety of rings due to intensified fragmentation of HMDSO molecules and this effect becomes dominant over the effect of silver incorporation.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors acknowledge funding from the Operational Program for Integrated Infrastructure [project ITMS 313011AUH4].

REFERENCES

- [1] E. O. Mikhailova, "Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application," *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 11, no. 4, p. 84, 2020. doi: 10.3390/jfb11040084.
- [2] C. Levard *et al.*, "Sulfidation of Silver Nanoparticles: Natural Antidote to Their Toxicity," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 23, pp. 13440–13448, Dec. 2013, doi: 10.1021/es403527n.
- [3] Y. Fennell, P. Yemele-Leki, T. Azeezat Adegboye, and K. L. Jones, "Impact of Sulfidation of Silver Nanoparticles on Established *P. aeruginosa* Biofilm," *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 08, no. 01, pp. 83–95, 2017, doi: 10.4236/jbnb.2017.81006.
- [4] H. Biederman, "Plasma Polymer Films." PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., p. 392, Aug. 01, 2004. doi: doi:10.1142/p336.
- [5] N. Alissawi, T. Peter, T. Strunskus, C. Ebbert, G. Grundmeier, and F. Faupel, "Plasma-polymerized HMDSO coatings to adjust the silver ion release properties of Ag/polymer nanocomposites," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 11, p. 2080, 2013, doi: 10.1007/s11051-013-2080-9.
- [6] H. Biederman, P. Hlídaek, J. Pešička, D. Slavínská, and V. Stundžia, "Deposition of composite metal/C:H films — the basic properties of Ag/C:H," *Vacuum*, vol. 47, no. 11, pp. 1385–1389, 1996, doi: [https://doi.org/10.1016/S0042-207X\(96\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0042-207X(96)00185-6).
- [7] P. Hlídaek, J. Hanuš, H. Biederman, D. Slavínská, and J. Pešička, "Composite Ag/C:H:N films prepared by planar magnetron deposition," *Thin Solid Films*, vol. 516, no. 14, pp. 4581–4586, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.05.085>.
- [8] C. Saulou, B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, and M. Mercier-Bonin, "Plasma deposition of organosilicon polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 3, Supplement, pp. S35–S39, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.04.118>.
- [9] H. Wang, L. Wang, and X. Wang, "Structure characterization and antibacterial properties of Ag-DLC films fabricated by dual-targets HiPIMS," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 410, p. 126967, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2021.126967.
- [10] A. Grill and D. A. Neumayer, "Structure of low dielectric constant to extreme low dielectric constant SiCOH films: Fourier transform infrared spectroscopy characterization," *J. Appl. Phys.*, vol. 94, no. 10, p. 6697, Oct. 2003, doi: 10.1063/1.1618358.
- [11] M. Wojdyr, "Fityk: A general-purpose peak fitting program," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 43, no. 5 PART 1, pp. 1126–1128, 2010, doi: 10.1107/S0021889810030499.
- [12] J. H. Solheim, F. Borondics, B. Zimmermann, C. Sandt, F. Muthreich, and A. Kohler, "An automated approach for fringe frequency estimation and removal in infrared spectroscopy and hyperspectral imaging of biological samples," *J. Biophotonics*, vol. 14, no. 12, p. e202100148, Dec. 2021, doi: 10.1002/JBIO.202100148.
- [13] G. Dakroub, T. Duguet, J. Esvan, C. Lacaze-Dufaure, S. Roualdes, and V. Rouessac, "Comparative study of bulk and surface compositions of plasma polymerized organosilicon thin films," *Surfaces and Interfaces*, vol. 25, p. 101256, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.SURFIN.2021.101256.
- [14] P. Bornhauser and G. Calzaferri, "Ring-opening vibrations of spherosiloxanes," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 6, pp. 2035–2044, 1996, doi: 10.1021/JP952198T/SUPPL_FILE/JP2035.PDF.
- [15] C. Marcolli and G. Calzaferri, "Vibrational Structure of Monosubstituted Octahydrosilasesquioxanes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, no. 25, pp. 4925–4933, Jun. 1997, doi: 10.1021/JP9707596.
- [16] H. Kaya, D. Ngo, S. Gin, and S. H. Kim, "Spectral changes in Si–O–Si stretching band of porous glass network upon ingress of water," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 527, p. 119722, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.JNONCRYSQL.2019.119722.
- [17] P. G. Pai, S. S. Chao, Y. Takagi, and G. Lucovsky, "Infrared spectroscopic study of SiO_x films produced by plasma enhanced chemical vapor deposition," *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, vol. 4, no. 3, pp. 689–694, Jun. 1986, doi: 10.1116/1.573833.
- [18] G. Lucovsky, M. J. Mantini, J. K. Srivastava, and E. A. Irene, "Low-temperature growth of silicon dioxide films: A study of chemical bonding by ellipsometry and infrared spectroscopy," *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Process. Phenom.*, vol. 5, no. 2, p. 530, Jun. 1987, doi: 10.1116/1.583944.

Mechanical properties of silver nanoparticle-based thin films prepared by high target utilization sputtering

T. Fiantok^{1,*}, V. Izaii¹, M. Truchlý¹, M. Vidiš¹, T. Roch², Š. Nagy³, Marián Haršáni⁴, P. Kúš³, M. Mikula^{2,3}

¹*Detached Workplace of Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University in Bratislava, Sadová 1148, 038 53, Turany, Slovakia*

²*Department of Experimental Physics, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University in Bratislava, Mlynská Dolina F2, 842 48 Bratislava, Slovakia*

³*Institute of Materials and Machine Mechanics SAS, Dúbravská cesta 9, 845 11, Bratislava, Slovakia*

⁴*STATON s.r.o., Sadová 1148, 038 53, Turany, Slovakia*

***Corresponding author:** tomas.fiantok@fmph.uniba.sk

ABSTRACT:

In the end of 2019, the acute respiratory virus SARS Cov-2, became pandemic. Disease invoked the need for development of protective measures against the rapid spread among the people and prevention of infection, in the most serious cases, leading to death.

One of the possible solution is the use of PVD technology to coat the surface with antimicrobial element (Ag, Cu, Ti, ...), specially in form of nanoparticles. Due to the higher volume to surface ratio, compared to conventional thin films, nanoparticle based thin films posses potentially higher chance for virus inactivation.

In this paper, we focus on the preparation of thin films based on Ag nanoparticles embedded in an amorphous polymer matrix Si-O-C-H, using the High Target Utilization Sputtering (HiTUS) technology, where we investigate the influence of HMDSO amount (polymer matrix base) on adhesion and mechanical properties on different types of substrates.

KEYWORDS (HiTUS, nanoparticles, silver, adhesion, mechanical properties)

INTRODUCTION

Infamous Covid 19 disease is caused by rapidly spreading acute respiratory syndrome coronavirus. Until november of 2022, the total of more than 633 milion infection cases are known with 6.6 milion of confirmed deaths. Due to such sorrowful statistics, demand for developement of effective protective measures against spread and infection arise [1, 2].

Main disadvantage of current protective measures is time-limited protective effect and necessity for frequent replacement or frequent repeated disinfection. Solution to retain protective effect is the application of coatings based on antimicrobial elements (Ag, Cu, Ti, ...). It is widely known that silver posses strong antibacterial activity in combination with high biocompatibility [3, 4, 5]. Furthermore, literature shows that further increase in antimicrobial activity can be obtained by modification of thin film nanostructure – preparation of nanoparticles (NPs) based thin film. As a result, NPs based thin film intrinsically exhibit higher surface to volume ratio than conventional thin film. Such NPs have been described to damage bacterial structure cell via prolonged release of Ag⁺ ions more effectively than conventional films. Due to high antimicrobial activity and low cytotoxicity Nps based thin films have been widely employed in medicine [4, 5]. Nowadays, different approaches are developed and investigated to find the most reliable, eco-friendly, stable, economically favorable method to produce NPs with sufficient adhesion on different types of substrates [6, 7].

In our work, we investigate specific Physical Vapour Deposition (PVD) method – High Target Utilization Sputtering (HiTUS). Here, we prepare Ag NPs embedded in organosilicon polymer matrix based on condensed Hexamethyldisiloxane (HMDSO). Thin films based on HMDSO are very well known for their superhydrophobic and adhesion improving properties [8]. Therefore, the effort is to prepare thin films with combination of excellent antimicrobial activity and hydrophobic behaviour with sufficient adhesion. However, in this work, main focus is dedicated to the investigation of an influence of amount of HMDSO on physical properties - the chemical composition, morphology, structure, adhesion and mechanical properties of NPs embedded in organosilicon polymer matrix.

EXPERIMENTAL DETAILS

The samples were prepared by the technology of HITUS by sputtering from Ag (100 mm in Dia., 99.95%) target and condensation of organosilicon compound HMDSO into polymer matrix. The substrates were mirror polished, ultrasonically and chemically (3 x 5 minutes in acetone, isopropyl alcohol and distilled water) cleaned c-cut sapphire (0001) and silicon (001) wafers (8 x 8 mm²), placed opposite to the center of the target, in the distance of approximately 25 cm. The base vacuum pressure was below 1×10^{-3} Pa for each of the deposition processes. Chamber was filled with Ar gas to total pressure of 0.65 Pa. Power density on the Ag target was set to constant 6.37 W/cm² (500 W). HMDSO partial pressure was changed from 0 Pa to 0.5 Pa. All depositions were conducted at room temperature.

Chemical composition characterization was performed by scanning electron microscopy (SEM, Thermofisher Scientific Apreo 2) in combination with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS, INCA Oxford Instruments). Detailed investigation of nanostructure of the selected samples was conducted by scanning transmission electron microscopy (STEM, FEI Titan) operated at 200 kV. Phase analysis of the samples was carried out via X-ray diffraction (XRD) method in Bragg-Brentano geometry, using PANalytical X'Pert diffractometer with Cu K α radiation. Hardness H and Young's modulus E were measured using a nanoindenter Anton Paar NHT² equipped with Berkovich diamond tip and determined via the Oliver and Pharr method [9]. During measurement, constant load of 0.5 mN was applied. The results were obtained by average over 16 measurements. Adhesion measurements were carried out using empirical method – scratch test using Bruker equipped with Rockwell diamond tip, with increasing load up to 30 N and total distance of 3 mm as an average over 5 values at each sample. In this work, adhesion was defined as a critical load at which coating delamination occurs.

RESULTS

Elemental EDS analysis of the samples (TABLE I.) revealed strong influence of the partial pressure of HMDSO on the chemical composition. As it was expected, a gradual decrease in Ag amount can be seen at the expense of C, O and Si, by increasing partial pressure of HMDSO.

TABLE I. Chemical composition of the samples from deposition series with different partial pressure of HMDSO ($p(\text{HMDSO})$) during deposition, $P/S_{(\text{targ})}$ is the power density on the Ag target.

Chemical composition (at. %)					
$P/S_{(\text{targ})} = 6.37 \text{ W/cm}^2$					
SAMPLE No	$p(\text{HMDSO})$ (Pa)	Ag	O	Si	C
SAMPLE 1	0.1	57.23	7.83	15.27	19.66
SAMPLE 2	0.2	39.93	12.45	24.26	23.36
SAMPLE 3	0.5	16.01	18.24	33.78	31.97

As can be seen in fig. 1, in the diffraction pattern of the sample with highest amount of Ag, we identified reflexions belonging to cubic Ag (Fm-3m) phase. Amorphous background from polymer matrix is not possible to identify without sufficient standard calibration. However, as was expected, increasing of HMDSO partial pressure results in decrease of Ag amount (table I) and leads to reduction of the intensity of all Ag reflexions.

From the view of mechanical properties (fig. 1), increase of HMDSO partial pressure leads to increase in the values of hardness from $H^{\text{SAMPLE1}} = 0.7 \text{ GPa}$ to $H^{\text{SAMPLE3}} = 2.4 \text{ GPa}$, Young's moduli from $E^{\text{SAMPLE1}} = 16 \text{ GPa}$ to $E^{\text{SAMPLE3}} = 28 \text{ GPa}$ and critical load for delamination $L_c^{\text{SAMPLE1}} = 8.1 \text{ GPa}$ to $L_c^{\text{SAMPLE3}} = 21.9 \text{ GPa}$. In pure HMDSO matrix, no crack propagation was observed below load of 50 N.

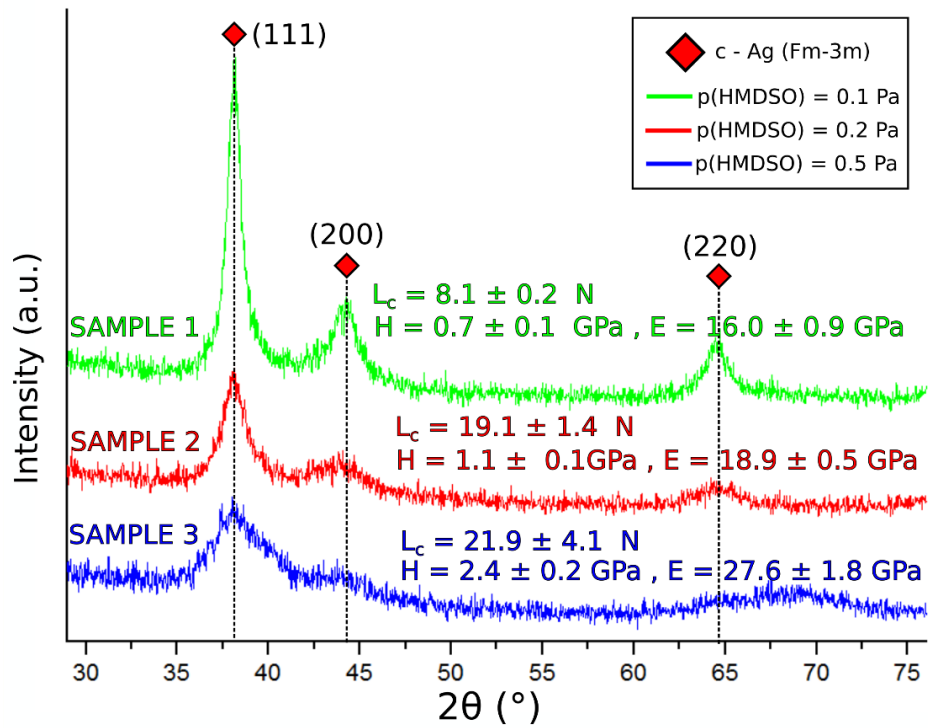


Fig. 1. XRD patterns of the as-dep samples from deposition series with different HMDSO partial pressure p(HMDSO) with corresponding hardness H, Young's moduli E, and critical load value for coating delamination L_c .

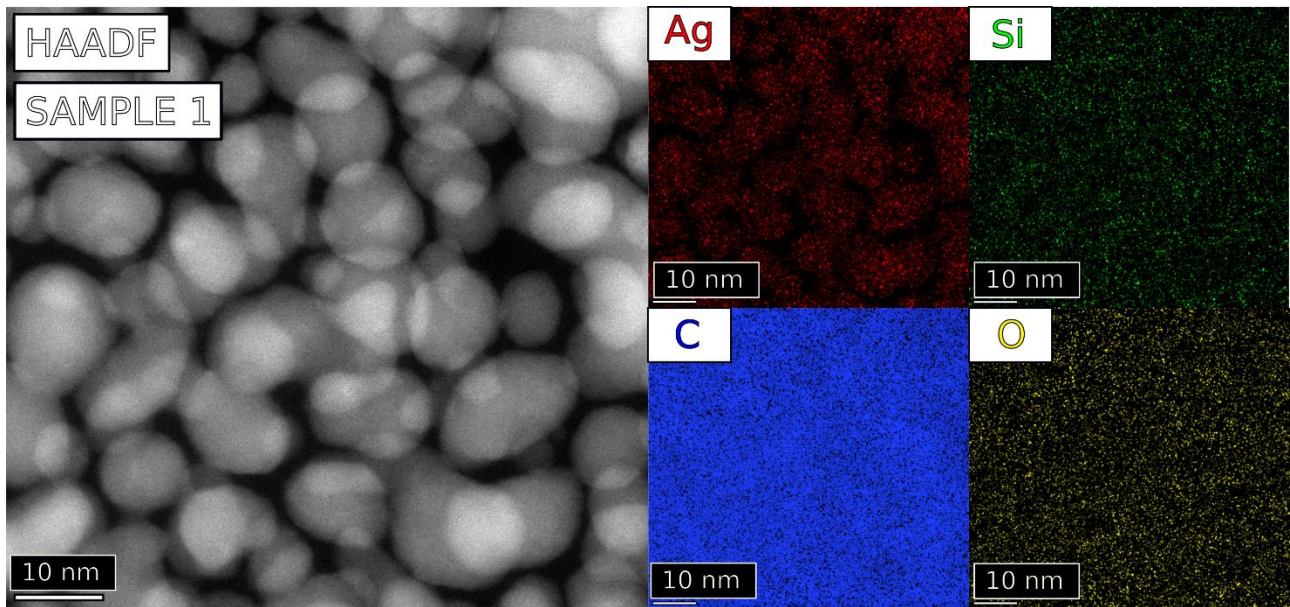


Fig. 2. STEM planar view of sample 1, with EDS elemental composition maps

Detailed investigation of the nanostructure on atomic scale provided planar view from STEM (Fig. 2). Planar view confirmed presence of nanoparticles embedded in polymer matrix. Moreover, elemental EDS analysis clearly confirmed chemical separation between Ag NPs and polymer matrix.

CONCLUSION

We verified the usage of the technology of HiTUS for preparation of silver nanoparticles based thin films embedded in polymer matrix based on Si-O-C-H. We showed that the HMDSO partial pressure has a significant role in resulting chemical composition. Based on the results from XRD and STEM, it has been shown that our films have crystalline character, exhibiting cubic (Fm-3m) Ag nanoparticles embedded in organosilicon polymer matrix. Moreover, increase of HMDSO partial pressure resulted in improvement of the mechanical properties, specifically increase in hardness and adhesion. Results were identical, independently on the substrate selection. We believe, there will be an optimal candidate between our samples with sufficient adhesion, hydrophobic and antimicrobial properties. However, these considerations have not been experimentally verified yet and call for further experiments.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by an Operational Program Integrated Infrastructure (Project No. ITMS 313011AUH4)

LITERATURE

- [1] Symptoms of Coronavirus". *U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*. 13 May 2020. Archived from the original on 17 June 2020. Retrieved 18 June 2020. [Y]COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU)". *ArcGIS*. Johns Hopkins University.
- [2] CENNIMO, David J.. 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) (COVID-19). *Medscape eMedicine* (Medscape), 2020-02-12.
- [3] J. Gaviria et al., Synthesis and deposition of silver nanoparticles on porous titanium substrates for biomedical applications, *Surface and Coatings Technology*, Vol. 406, 2021, 126667, ISSN 0257-8972.
- [4] D. P. Perez, ed. *Silver Nanoparticles* (London: IntechOpen, 2010), 10.5772/186.
- [5] V. Alt et al., *Biomaterials* 25 (2004), 4383–4391.
- [6] Piszczek, P. et al., Silver Nanoparticles Fabricated Using Chemical Vapor Deposition and Atomic Layer Deposition Techniques: Properties, Applications and Perspectives: Review. In: Seehra, M. S. , Bristow, A. D. , editors. *Noble and Precious Metals - Properties, Nanoscale Effects and Applications*, London: IntechOpen; 2017.
- [7] Goldby, I.M. , Issendorf, B.v. Kuipers, L. and Palmer, R.E. Gas condensation source for production and deposition of size-selected metal clusters. *Rev. Sci. Instrum.* 68, 3327 (1997).
- [8] Q. Trinh et al., Deposition of superhydrophobic coatings on glass substrates from hexamethyldisiloxane using a kHz-powered plasma jet, *Surface and Coatings Technology*, Vol. 361, 2019.
- [9] W.C. Oliver and G.M. Pharr, *J. Mater. Res.* 7, 1564 (1992).

Antibakteriálny povlak na báze striebrom dopovaného diboritu titánu

Marek Vidiš¹, Martin Truchlý¹, Vitalii Izai¹, Tomáš Fiantok¹, Miroslav Rajnec², Tomáš Roch³, Leonid Satrapinsky³, Marián Haršáni⁴, Peter Kúš³ and Marián Mikula³

¹ Detašované pracovisko Turany, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská Dolina F2, 842 48 Bratislava

² Centrum biológie rastlín a biodivezity, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra

⁴ Staton, s.r.o., Sadová 1148, 038 53 Turany

³ Katedra experimentálnej fyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská Dolina F2, 842 48 Bratislava

Korešpondenčná adresa: marek.vidis@fmph.uniba.sk

Úvod

Fyzikálna depozícia z pár (PVD) je suchý proces, ktorý umožňuje prípravu antibakteriálnych Ag vrstiev bez produkcie vedľajších tekutých produktov kontaminovaných Ag. Napriek tomu, že aj jednozložkové magnetrónom naprašované Ag tenké vrstvy majú výrazný antibakteriálny účinok [1], takéto vrstvy nie sú vhodné pre praktické aplikácie. Keďže čisté Ag je mäkký kov, jeho tenká vrstva by mala nedostatočnú mechanickú odolnosť a výrazne obmedzenú výdrž. Preto sa v súčasnosti študujú kompozitné povlaky Ag uložené v mechanicky pevnejšej matici. Typickým príkladom je kompozit Ag nanočastíc uložených v polymérnej matici HMDSO [2]. Takáto technológia umožňuje zvýšiť odolnosť povlaku a kontrolovať rýchlosť uvoľňovania Ag.

Ďalším vhodným kandidátom na mechanicky odolnú maticu je diborid titánu, dobre známy ako supertvrдый materiál s vynikajúcou chemickou stabilitou [3]. Okrem toho bolo preukázané, že TiB₂ je biokompatibilný materiál [4]. Pridanie TiB₂ do Ag sa často skúma pre aplikácie v elektronike ako kontaktný materiál odolný voči elektrickému oblúku [5]. Takýto materiál však pozostáva prevažne z Ag s koncentráciou TiB₂ len niekoľko percent a jeho antibakteriálne vlastnosti neboli skúmané. V tejto práci sme pripravili kompozitné vrstvy Ag/TiB₂ so širokým rozsahom koncentrácie Ag od 0 do 21.2 atomárnych percent (at.%) a skúmali ich chemické, mechanické a antibakteriálne vlastnosti.

Materiál a metódy

Kompozitné vrstvy Ag/TiB₂ sa pripravili magnetrónovým naprašovaním z Ag a TiB₂ terčov. Výkon na TiB₂ terči bol udržiavaný na 1000 W, výkon na Ag terči bol nastavený na 0, 10, 20, 50, 100 W. Zafírové, kremíkové a oceľové substráty K100 boli pred depozíciou ultrazvukovo čistené v acetóne, izopropylalkohole a destilovanej vode. Na zvýšenie adhézie sa použila 150 nm hrubá chrómová vrstva.

Prvkové zloženie sa analyzovalo energeticky disperznou röntgenovou spektroskopiou (EDS, INCA Oxford Instruments). Kryštalografická štruktúra vybraných vrstiev bola analyzovaná pomocou

röntgenovej difrakcie (XRD, PANalitical X'Pert Pro) v symetrickom usporiadaní. Mechanické vlastnosti boli merané na Al_2O_3 substrátoch pomocou nanoindentora (Anton Paar NHT2) s použitím Berkovichovho diamantového hrotu a hĺbky vtláčenia menšej ako 10% hrúbky vrstvy. Koeficient trenia (COF) bol meraný tribometrom (Brucker UMT 2) v konfigurácii ball-on-disk pri zaťažení 5 N.

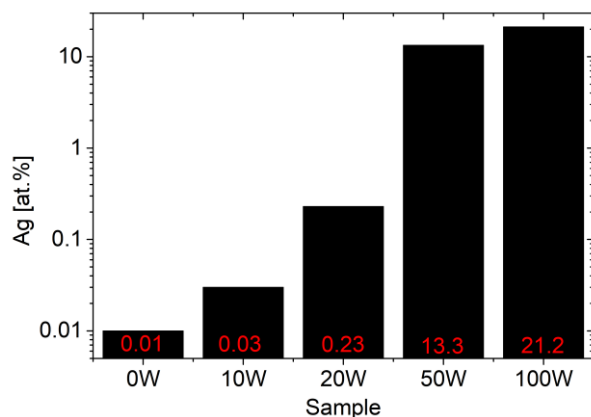
Antibakteriálny účinok sa analyzoval testom inhibície rastu *E. coli* vykonaným v mikrotitračnej platničke v objeme 300 μL s hustotou kultúry 1.5×10^6 buniek/ml. Ako kontrola bol použitý materiál bez strieborného povlaku. Po 3 hodinách inkubácie pri 37 °C sa meral rast *E. coli* odčítaním absorbancie pri 590 nm. Získané hodnoty optickej hustoty sa použili na vyhodnotenie inhibičného účinku testovaných vrstiev.

Výsledky a diskusia

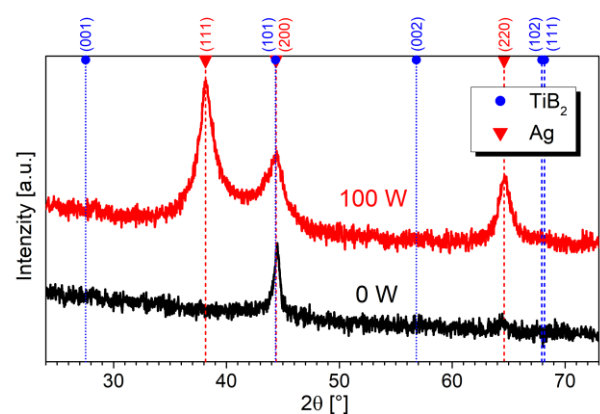
Prvková EDS analýza ukazuje rastúcu koncentráciu Ag vo vrstvách so zvyšujúcim sa výkonom na Ag terči ako je znázornené na obr. 1. Maximálna koncentrácia Ag dosahuje 21.2 at.% pre vzorku pripravenú s výkonom 100 W na Ag terči.

Štruktúra AgB_2 nie je termodynamicky stabilná a preto sa neočakáva tvorba tuhého roztoku $\text{Ag}_y\text{Ti}_{1-y}\text{B}_2$. Namiesto toho sa očakáva, že v matici TiB_2 sa vytvorí kovová Ag fáza, čo bolo potvrdené aj pomocou XRD, ako je možné vidieť na obr. 2. Difrakčný obrazec referenčnej TiB_2 vrstvy (0 W na Ag terči) ukazuje iba jedno difrakčné maximum pri 44.5°, čo zodpovedá (101) difrakcii hexagonálnej fázy TiB_2 . Vo vrstve obsahujúcej 21.2 at.% Ag sa objavujú ďalšie maximá pri 38.1°, 44.4° a 64.6° zodpovedajúce (111), (200) a (220) difrakcii kubickej Ag fázy. Okrem toho pridanie Ag vedie k rozšíreniu maxima TiB_2 (101), čo naznačuje zjemnnie kryštalickej štruktúry.

Tenké vrstvy diboridu titánu sú známe svojou vysokou tvrdosťou viac ako 40 GPa [6]. Ich koeficient trenia (COF) je však vysoký, čo obmedzuje ich praktické aplikácie. Na druhej strane striebro má nízky COF a môže byť použité ako tuhé mazivo. Vplyv Ag na COF v kompozite



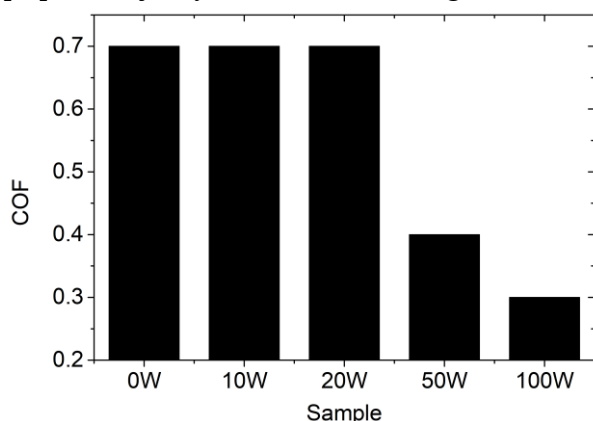
Obr.1: Koncentrácia stribera v Ag/TiB_2 vrstvách pre vzorky s rôznym výkonom na Ag terči.



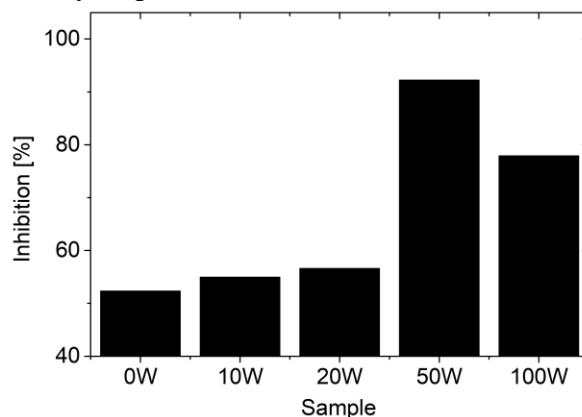
Obr.2: XRD skeny v symetrickom θ/θ usporiadaní pre vzorky pripravené s výkonom 0 a 100 W na Ag terči.

Ag/TiB₂ je znázornený na obr. 3. Môžeme vidieť, že pridanie Ag do TiB₂ významne znížilo trenie pri koncentrácii Ag nad 13.3 at.%. Celkovo sa COF znižuje z 0.7 pre čistý TiB₂ na 0.3 pre kompozitné Ag/TiB₂ s 21.2 at.% Ag. V porovnaní s referenčným TiB₂ sa tvrdosť Ag/TiB₂ s 21.2 at.% Ag znížila na 4.7 ± 0.3 GPa, čo je však stále viac ako tvrdosť napríklad nehrdzavejúcej ocele a oveľa vyššie ako u čistej Ag vrstvy.

Antibakteriálny účinok vrstiev v porovnaní s nepovlakovanými Si substrátmi je znázornený na obr. 3. Inhibícia rastu dosahuje 52% aj pre referenčnú TiB₂ vrstvu. Pridanie Ag vedie k zvýšeniu antibakteriálneho účinku, ktorý dosahuje maximálnu hodnotu 92% pri vrstve s 13.3 at.% Ag pripravenej s výkonom 50 W na Ag terči. Uvedené hodnoty sú priemerom ôsmich meraní.



Obr. 3: Koefficient trenia oproti ocelevej guľičke pre vrstvy pripravené na ocelovom substráte K100.



Obr. 4: Inhibícia rastu *E. Coli* pre vrstvy pripravené na Si substráte.

Záver

Pridanie Ag do TiB₂ vedie k vytvoreniu nanokompozitu zloženého z Ag častíc uložených v tvrdej matici TiB₂. Kompozit s obsahom Ag 21.2 at.% vykazuje znížený koeficient trenia 0.4 v porovnaní s 0.7 pre referenčnú vrstvu TiB₂. Vzorka s najvyšším antibakteriálnym účinkom 92% obsahuje 13.3 at.% Ag a vykazuje tvrdosť 17.7 GPa. Napriek nižšej tvrdosti výsledného povlaku je Ag/TiB₂ stále tvrdší ako nehrdzavejúca oceľ, čo naznačuje zlepšenú odolnosť proti opotrebovaniu a zvýšenú odolnosť antibakteriálnych povlakov na báze striebra.

Podakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore operačného programu Integrovaná infraštruktúra (Projekt č. ITMS 313011AUH4).

Literatúra

- [1] M.I. Mejía, G. Restrepo, J.M. Marín, R. Sanjines, C. Pulgarín, E. Mielczarski, J. Mielczarski, J. Kiwi, Magnetron-sputtered ag surfaces. New evidence for the nature of the Ag ions intervening in bacterial inactivation, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2 (2010) 230–235.
<https://doi.org/10.1021/am900662q>.
- [2] A. Kuzminova, J. Beranová, O. Polonskyi, A. Shelemin, O. Kylián, A. Choukourov, D. Slavínská, H. Biederman, Antibacterial nanocomposite coatings produced by means of gas aggregation source of silver nanoparticles, *Surf. Coatings Technol.* 294 (2016) 225–230.
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.03.097>.
- [3] S.H. Lee, K.H. Nam, S.C. Hong, J.J. Lee, Low temperature deposition of TiB₂ by inductively coupled plasma assisted CVD, *Surf. Coatings Technol.* 201 (2007) 5211–5215.
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.07.209>.
- [4] F.M. Makau, K. Morsi, N. Gude, R. Alvarez, M. Sussman, K. May-Newman, Viability of Titanium-Titanium Boride Composite as a Biomaterial, *ISRN Biomater.* 2013 (2013) 1–8.
<https://doi.org/10.5402/2013/970535>.
- [5] Y. Liu, X. Wang, H. Li, J. Lu, Z. Wang, C. Zhou, Enhancing properties of AgTiB₂ contact material by CuO semi-coated TiB₂ composite particles, *Mater. Lett.* 293 (2021) 5–8.
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.129703>.
- [6] M. Mikula, B. Grančič, V. Buršíkovič, A. Csuba, Š. Držík, M. Kavecký, A. Plecenik, P. Kúš, Mechanical properties of superhard TiB₂ coatings prepared by DC magnetron sputtering, *Vacuum*. 82 (2008) 278–281. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2007.07.036>.

Pilot study: the comparison of serum N-glycoprofiles of Wistar and SHR rats

Zuzana Brnoliakova¹, Zuzana Pakanova², Lucia Rackova¹, Marek Nemcovic²

¹ *Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Center of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, SR;* ² *Chemistry Institute, Slovak Academy of Sciences, SR;*

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a cluster of cardio-metabolic risk factors and comorbidities conveying high risk of both cardiovascular disease [1] and type 2 diabetes mellitus (T2DM). The underlying aetiology of this clustering has been the subject of much debate [2]. Criteria for clinical diagnosis of MetS include elevated waist circumference, blood pressure (BP), levels of serum triglycerides and fasting glucose, and reduced levels of high-density lipoproteins (HDL) cholesterol [3]. Several studies, based on the clinical, patophysiological, genetic, translational or proteomic background of MetS were published [4-6], however, the effect of posttranslational modifications and their role in MetS still raises many questions.

Thus, the basic experimental rat models might offer a reliable alternatives for studying MetS pathologies. Up to this date, little is known regarding the changes in N-glycans during MetS in rodents, but observed similarities between the glycomic profile of rat and human sera provided important selection criteria for choosing an appropriate animal model for pathological and further pharmacological studies [7]. Wistar rats (W) are an albino strain widely used in biological and medical research for their common attributes providing satisfactory scale-up outcomes for pre-clinical predictions [8]. Spontaneously hypertensive rats (SHR) have been developed as animal models for human essential (idiopathic or primary) hypertension [9-10].

The main goals of our pilot study were: *i*) to describe the glycoprofiles of two different rats strains; *ii*) to evaluate their physiological and pathophysiological liaisons to the possible metabolic disturbances.

Material and Methods

All experimental procedures involving animals were approved by the Ethical Committee of the Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Animal Health and Animal Welfare Division of the State Veterinary and Food Diet Administration of the Slovak Republic (the number of the permit 3635/14-221) and they conformed to Directive 2010/63/EU on protection of animals used for scientific purposes. Adult male W and SHR rats aged 15 weeks were from the Breeding Station of the Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology (Dobra Voda, Slovakia). The rats had free access to water and food and were kept on 12h/12h light/dark cycle and housed 5 animals per cage. Animals were divided into two experimental groups (n = 10 rats/group) and fed standard diet.

The blood was collected from *plexus chorioideus*. ELISA diagnostics kits (Erba Lachema, CR) kits were used to determine the lipid profile from the blood serum. We measured levels of total cholesterol (CHOL), low-density lipoprotein (LDL), HDL, triacylglycerols (TAG) and glucose (Glu). The absorbances of the resulting colored compound was measured spectrophotometrically at 500 nm on LabSystems 352 Multiskan MS Microplate Reader (ThermoFisher Scientific, U.S.).

The level of BP of the animals was measured by non-invasive tail-cuff pletysmographic approach [11].

The analyses of serum N-glycoprofile by MALDI-TOF/MS equipment were done as follows: 10 µl of serum was premixed with 40 µl 10 mM Tris, pH 7.5 + 0.1% SDS and incubated with dithiothreitol (DTT) and iodoacetamide (IAA) according to standard protein reduction and alkylation protocols [12]. To release the N-glycans, serum was incubated with 1 enzyme unit (U) of PNGase F (peptide-N-glycosidase F, Roche) at 37°C overnight. Isolation of N-glycans was performed by PGC SPE (100 mg Supelclean ENVI-Carb, Supelco) as described previously [13] by 60% ACN + 0.1% TFA. To increase the signal intensities and stabilize the sialic acid, N-glycans were subjected to permethylation [14]. Permethyated N-glycans were analyzed by UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) in reflectron positive ion mode with 20 mg/ml DHB in 30% ACN + 1 mM NaOH as the matrix solution. Analyzed data were processed by FlexAnalysis (Bruker Daltonics) and GlycoWork Bench [15] software. Obtained MS and representative MS/MS spectra of free and permethylated N-glycans were compared and evaluated with a special focus on their N-glycan type.

The data were statistically evaluated using GraphPad Prism 6 Software (La Jolla, USA). Data were expressed as means ± SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the difference among all experimental groups (using the Bonferroni multiple comparison test). The level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant difference. The asterisks were used to mark significancy as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when comparing SHR vs W rats.

Results and Discussion

First, the basal biochemical parameters of lipid profile and BP levels of two different rats strains from healthy individuals were compared. The corresponding data are registered in **Tab. 1**. The glucose level did not differ among the experimental animals W vs SHR, however, in all other

Tab. 1.: The lipid profile and BP levels of W and SHR rats.

	Glu (mmol/l)	TAG (mmol/l)	CHOL (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)	BP (mmHg)
W	6.86±0.25	1.00±0.11	1.56±0.09	1.02±0.03	0.52±0.01	119.3±1.4
SHR	6.78±0.23	0.47±0.05***	1.19±0.03***	0.87±0.01***	0.41±0.03**	191.5± 1.7***

parameters of lipid profile as well as BP level, there were observed significant changes in SHR group compared to W rats. Since, within chronic civilization diseases, e.g. MetS or T2DM, are multifactorial the key role in their development act not only the environment factors (diet, physical activity, stress, life style) but also genetic predispositions. Thus, the use of different rats strains provides the opportunity to elucidate the interrelation between glycosylation changes and the pathophysiological conditions involved that might be reflected also within their glycoprofiles [16,17].

Second, the acquisition and characterization of glycomic profiles derived from blood sera of two different rats strains from healthy individuals were done. N-glycoprofiling of serum samples from two different rat's strains, led to the identification of more than 100 N-glycan structures. Out of them, accurately 38 relevant and most abundant N-glycan structures were selected. N-glycans were distributed in to the following structural classes according to their glycan type (values expressed as m/z that represents mass-to-charge ratio $[M + Na]^+$): High mannosylated (High – Man) - 1579.8; 1783.8; 1988.1; 2192.2; 2396.4; Complex Bi-antennary (C–Bi) – 1865.9; 1981.9; 2070.1; 2227.1; 2431.2; 2792.4; Complex Bi-antennary fucosylated (C–Bi–Fuc) – 1590.8; 1835.9; 2040.0; 2244.1; 2605.3; 2966.4; Complex Tri-antennary (C–Tri) – 2111.0; 2880.4; 3241.6; 3602.7; Complex Tri-antennary fucosylated (C–Tri–Fuc) – 3415.7; 3776.8; Hybrid - 2186.1; 2390.2; 2472.2; 2635.3; 2676.3; Hybrid fucosylated (Hybrid–Fuc) – 2081.1; 2285.1; 2489.3; 2663.3; 2807.4; 3837.4 and truncated sialylated (High – Sial) N-glycans – 3153.6; 3327.7; 3514.7; 3963.9. The relative intensities of N-glycans within different rat's strains, sorted into groups according to their glycan type are displayed in **Tab. 2**.

Tab. 2: The relative intensities of N-glycans in W and SHR rats according to their glycan type.

	W	SHR
High-Man	38.83 ± 3.52	17.01 ± 2.67 ***
C-Bi	29.46 ± 6.58	32.72 ± 3.48
C-Bi-Fuc	17.08 ± 2.68	26.31 ± 3.22 *
C-Tri	0.22 ± 0.18	2.48 ± 1.04
C-Tri-Fuc	ND	0.91 ± 0.19 ***
Hybrid	8.39 ± 0.50	7.57 ± 0.80
Hybrid-Fuc	6.02 ± 1.14	8.00 ± 0.97
High-Sial	ND	5.00 ± 1.72 *

The comparison of the relative quantitative intensities of N-glycans between W and SHR strains, revealed the most significant changes in the contribution of High-Man and C-Tri-Fuc type of N-glycans. The relative proportion of all High-Man N-glycans in SHR rats was, on average, at half of the level of their presence in W group. Interestingly, there were not detected (ND) any of C-Tri-Fuc or High-Sial N-glycans in W experimental group, while observed in SHR group. The level

C-Bi-Fuc and High-Sial were noticeably higher in SHR compared to W. That implies towards the respectable role of fucosylation and sialylation found in other studies as well [18,19]. The complex molecular bases of the glycomic changes are still under intensive research [20,21].

Our findings support the importance of prospective research into glycosylation alterations in different rats strains [22]. These data of blood sera glycoprofiling in experimental animals might assume as a possible tool for basic research to test therapeutic perspectives within various civilization and metabolic diseases. Further impact on clinical studies tendencies might be considered.

Acknowledgements

This contribution originated from the support of Operating Programme *Research and Innovations* for the project „*The study of structural changes of complex glycoconjugates in the proces of inherited metabolic and civilization diseases*”, No. ITMS 313021Y920, co-financed by the European Regional Development Fund. This article was also conducted within the research platform “TOXINOVA” declared in the APVV-18-0336 project and partially supported by the Slovak national grant VEGA 2/0104/21.

Literature

- [1] Silveira Rossi JL *et al.*, *Diabetes Metab Res Rev.* **2022**;38(3):e3502.
- [2] Zimmet P *et al.*, *J Intern Med.* **2019**;286(2):181.
- [3] Elhadad MA *et al.*, *Cardiovasc Diabetol.* **2021**;20(1):111.
- [4] Peng W *et al.*, *Expert Rev Proteomics.* **2018**;15(12):1007.
- [5] Dotz V and Wuhler M, *FEBS Lett.* **2019**;593(21):2966.
- [6] Šoić D *et al.*, *Mol Cell Proteomics.* **2022**;21(10):100407.
- [7] Gao WN *et al.*, *Sci Rep.* **2015**;5:12844.
- [8] Pereira RO *et al.*, *Arch Physiol Biochem.* **2021**; Dec 16;1-10.
- [9] Hallbäck M and Weiss L, *Med Clin North Am.* **1977**;61(3):593.
- [10] Yang S *et al.*, *Xenobiotica.* **2014**;44(1):77.
- [11] Knezl V *et al.*, *Interdiscip Toxicol.* **2017**;10(3):86.
- [12] Shevchenko A *et al.*, *Nat Protoc.* **2006**;1(6):2856.
- [13] Pažitná L *et al.*, *J Biotechnol.* **2020**;314-315:34.
- [14] Palmigiano A *et al.*, *Methods Mol Biol.* **2018**;1750:75.
- [15] Ceroni A *et al.*, *J Proteome Res.* **2008**;7(4):1650.
- [16] Miura Y *et al.*, *Biochim Biophys Acta.* **2016**;1860(8):1608.
- [17] Radovani B and Gudelj I, *Front Immunol.* **2022**;13:893365.
- [18] Rebelo A *et al.*, *J Neuroinflammation.* **2021**;18(1):116.
- [19] Seino J *et al.*, *Glycobiology.* **2016**;26(10):1072.
- [20] Dall'Olio F *et al.*, *Exp Suppl.* **2021**;112:303.
- [21] Paton B *et al.*, *Int J Mol Sci.* **2021**;22(11):5788.
- [22] Klarić TS *et al.*, *Glycobiology.* **2021**;31(5):636-648.

The assessment of glucometabolic hormones in blood serum of aging rats fed with high-fat diet

Zuzana Brnoliakova, Lucia Rackova

*Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Center of Experimental Medicine,
Slovak Academy of Sciences, SR*

Introduction

The field of ageing research has been rapidly advancing in recent decades and it had provided insight into the complexity of ageing phenomenon [1,2]. The biological age of an individual is relevantly influenced by metabolic state of the body, which is, in turn, linked to a life style and nutritional habits [3]. Nutritional interventions been shown to provide health benefits, including the life prolonging effect, in a range of experimental animals [4]. The results of recent human studies show that e.g. mild caloric restrictions can have beneficial effects in humans [5,6]. Since the nutrition is an important and readily modifiable risk factor for disease prevention, many studies have consistently proven steady relationship between diet and health including in older adults [7-9]. The regulatory hormones of glucagon and glucagon-like peptide 1 (GLP-1), both play an important role in glucose homeostasis [10]. The plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) is the major determinant of fibrinolytic activity and its concentrations are elevated in obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome [11].

In order to investigate the potential alterations in glucose metabolism regulation within aging, the blood serum levels of glucometabolic hormones were assessed on offspring of Sprague Dawley (SD) rats. SD is an albino outbred rats strain widely used in biomedical research including toxicology and pharmacology for its common attributes providing satisfactory scale-up outcomes for pre-clinical predictions [12]. To mimic the nutritional preferences of the western-style diet rich in high-fat, first we fed parental generation either with control (C) standard diet or high-fat diet (H, 1% cholesterol and 7.5% lard). Then, the type of diet continued within offspring generation: male SD rats were continuously fed with either control standard (C-C) or high fat diet (H-H, 1% cholesterol and 7.5% lard) until adulthood, almost two years.

The main goal of our study was to assess and evaluate the levels of glucometabolic hormones glucagon, GLP-1 and PAI-1 in aging offspring SD rats in respect of the administered nutritional differences with either standard or high-fat diets.

Material and Methods

All experimental procedures involving animals were approved by the Ethical Committee of the Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Animal Health and Animal Welfare Division of the State Veterinary and Food Diet Administration of the Slovak Republic (the number of the permit 3693/19-221/3) and they conformed to Directive 2010/63/EU on protection of

animals used for scientific purposes. SD rats were from the certified Breeding Animal Facility (Velaz, Czech Republic). The rats had free access to water and food and were kept on 12h/12h light/dark cycle and housed 5 animals per cage. Animals were divided into experimental groups (n = 10 rats/group). Parents animals (male and female) were fed with either control standard (C) or high-fat diet (H, 1% cholesterol and 7.5% lard) for 8 weeks prior mating, and then during pregnancy and lactation. Subsequently, the posterity continued in the type of parent's diet so it was fed with either control standard (C-C) or high fat diet (H-H, 1% cholesterol and 7.5% lard) until adulthood, up to 21st month.

The blood was collected from *plexus chorioideus* at the indicated time points of offspring life span (1st, 15th and 21st month). The serum levels of glucagon, GLP-1 and PAI-1 were thoroughly assessed by Multiplex magnetic bead-based immunoassays on Bio-Plex 200 systems (Bio-Rad, U.S.).

The data were statistically evaluated using GraphPad Prism 6 Software (La Jolla, USA). Data were expressed as means $\pm$ SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the difference among all experimental groups (using the Bonferroni multiple comparison test). The level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant difference. When comparing C-C vs H-H rats at all of the selected time points, the asterisks were used to mark significance as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.001$. For further comparisons the other types of symbols were used as listed here: # H-H: 15th vs 1st resp. C-C: 15th vs 1st; $\sqrt{}$ H-H: 21st vs 1st resp. C-C: 21st vs 1st; ^ H-H: 21st vs 15th resp. C-C: 21st vs 15th.

Results and Discussion

The assessment of glucometabolic hormones levels in blood serum of aging offspring SD rats were evaluated at specified time points such resembled the life span of rodents as follows: 1st month represented for pups, then 15th month constituted for adults animals and finally 21st month established for old ones. The appraisal of the acquired data was done in respect of the administered nutritional differences while fed either control standard or high-fat diet. The corresponding values are listed in **Tab. 1**.

Tab. 1.: The levels of glucometabolic hormones within the offspring of aging SD rats.

	GLP-1 (pg/ml)	Glucagon (pg/ml)	PAI-1 (pg/ml)
C-C-1 st	235.5 $\pm$ 52.4	3780.9 $\pm$ 176.8	61.3 $\pm$ 4.9
H-H-1 st	359.4 $\pm$ 21.5 *	7137.7 $\pm$ 149.9 ****	534.7 $\pm$ 57.9 ****
C-C-15 th	247.3 $\pm$ 10.9	8975.1 $\pm$ 3493.6 ####	258.4 $\pm$ 18.4 ####
H-H-15 th	952.3 $\pm$ 96.7 **** ###	25375.9 $\pm$ 5291.7 **** ####	1449.9 $\pm$ 44.8 **** ####
C-C-21 st	193.7 $\pm$ 5.1 ^^^	14402.5 $\pm$ 701.9 $\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{}}}}}$ ^^^	921.1 $\pm$ 76.5 $\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{}}}}}$ ^^^
H-H-21 st	1953.4 $\pm$ 231.8 **** $\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{}}}}}$ ^^^	23782.7 $\pm$ 859.0 **** $\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{}}}}}$	3796.5 $\pm$ 247.2 **** $\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{\sqrt{}}}}}$ ^^^

When comparing H-H vs C-C experimental groups, at all selected time points (1st, 15th and 21st months of age) there were remarkable shifts upwards within all of the measured parameters, namely glucagon, GLP-1 and PAI-1. Moreover, there was also obvious certain dynamics of glucose metabolites correlated with the age progression of W offspring rats: e.g. *i*) the level of GLP-1 in H-H group was progressively increasing, correlating with the duration of the experiment, while in C-C group stays stable; *ii*) similarly the level of PAI-1 in both C-C and H-H group were gradually increasing, correlating with the duration of the experiment; *iii*) the level of glucagon dramatically increased when comparing H-H:15th vs 1st month of the experiment, then stays rigid, however while considering C-C group correlated along with the proceeding age of the animals.

By monitoring nutrient-induced GLP-1 secretion over time during diet-induced obesity development in rats, Hira *et al.*, showed that GLP-1 secretion was enhanced in diet-induced obese rats compared with control rats [13]. Thus, the postprandial GLP-1 response is likely to play a protective role against glucose intolerance [14].

PAI-1 is closely related to the development of metabolic syndrome, glucose homeostasis impairment and lipid metabolism disbalances [15]. Recent studies showed that PAI-1 might contribute to the development of glucose intolerance, and have pro-atherogenic properties [16].

Our findings are in good agreement with studies supported the importance of the evaluation of glucometabolic hormones levels within pathophysiology of aging [17], especially when combined and potentiated with western-type diet rich in fat [18]. These data from long-term *in vivo* experiment on aging offspring of SD rats might possibly elucidate the glucose metabolism variations related to the nutritional preferences. Moreover, the further insights into mechanisms of senescence might be clarified with perspective towards the research of various civilization and metabolic diseases. Additional impact on clinical studies tendencies might be also considered.

Acknowledgements

This contribution originated from the support of Operating Programme *Research and Innovations* for the project „*The study of structural changes of complex glycoconjugates in the process of inherited metabolic and civilization diseases*”, No. ITMS 313021Y920, co-financed by the European Regional Development Fund. This article was also conducted within the research platform “TOXINOVAGE” declared in the APVV-18-0336 project and partially supported by the Slovak national grant VEGA 2/0104/21.

Literature

- [1] Jolly CA, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **2005**;8(4):382.
- [2] Rackova L *et al.*, *Environ Toxicol Pharmacol*. **2021**;84:103611.
- [3] Mattson MP *et al.*, *Ageing Res Rev*. **2017**;39:46.
- [4] Xu XM *et al.*, *PLoS One*. **2015**;10(12):e0144442.
- [5] Golbidi S *et al.*, *Curr Diab Rep*. **2017**;17(12):123.
- [6] Varady KA *et al.*, *Nat Rev Endocrinol*. **2022**;18(5):309.
- [7] Salazar N *et al.*, *Curr Issues Mol Biol*. **2020**;36:33.

- [8] Stefler D *et al.*, *J Hum Hypertens*. **2019**;33(9):671.
- [9] Malesza IJ *et al.*, *Cells*. **2021**;10(11):3164.
- [10] Bray JJH *et al.*, *Diabetes Obes Metab*. **2021**;23(8):1806.
- [11] Basurto L *et al.*, *Gynecol Endocrinol*. **2019**;35(10):909.
- [12] Khanna S *et al.*, *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2020**;113(9):1345.
- [13] Hira T *et al.*, *Trends Endocrinol Metab*. **2020**;31(2):71.
- [14] Tomasiuk R. *Am J Mens Health*. **2022**;16(4):15579883221108895.
- [15] Pinyo J *et al.*, *Br J Nutr*. **2019**;122(4):411.
- [16] Kim JE *et al.*, *Molecules*. **2022**;27(2):334.
- [17] Castro-Barquero S *et al.*, *Mol Nutr Food Res*. **2022**;e2200264.
- [18] Chatterjee S *et al.*, *World J Diabetes*. **2016**;7(18):441.

Hexahydropyridoindoles as potential inducers of cellular antioxidant and anti-inflammatory response

Lucia Rackova, Zuzana Brnoliakova

*Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Center of Experimental Medicine,
Slovak Academy of Sciences, SR*

Introduction

Among the various synthesized hexahydro-pyridoindole derivatives, the compound (±)-cis-8-methoxy-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole-2-carboxylic acid ethyl ester (SMe1EC2) [1] has been subjected to several preclinical studies. In particular, it showed significant neuroprotective and antioxidant effects in the murine model of acute head trauma [2], rat hippocampal slices exposed to reversible hypoxia/low glucose [2, 3], brain cortex homogenates of young rats treated with Fe²⁺/ascorbic acid pro-oxidative system [4] and HT22 hippocampal neuronal cells subjected to high glucose [5]. Moreover, in our *in vivo* study, 8-week supplementation with SMe1EC2 showed a moderately enhancing effect on cognitive function in aged rats [6]. SMe1EC2 also improved cardiometabolic parameters and reduced oxidative stress and inflammatory markers in our experimental model of metabolic syndrome [7].

In the present study, we assessed the potential effect of SMe1EC2 on the expression levels of antioxidant and anti-inflammatory mediators and pro-inflammatory markers in activated murine BV-2 microglial cells.

Materials and Methods

Cells were plated in a 6-well plate at the density of 60,000 cells/cm², grown for 24 h followed by 16h incubation in DMEM with LPS (2µg/ml) with or without SMe1EC2 (200µmol/l). Next, the cells were lysed in Cell Lysis Buffer (1X, Cell Signalling Technologies, Inc.) with 1mM PMSF and homogenized by passing 15 times through a 25G-needle followed by 20 min incubation on ice and centrifugation (12 000 rpm, 4°C, 15 min). Then, equal amounts (30µg) of proteins were denatured and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Next, proteins were transferred by Western blotting to the nitrocellulose membrane. Membranes were afterward blocked with 3 % BSA or 5 % non-fat milk in PBS-T (PBS with 0.1 % (v/v) Tween-20) for 2h and incubated with primary antibodies against inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), heme oxygenase-1 (HOX-1) and β-actin (Cell Signalling Technologies, Inc.) overnight at 4°C. After four washes with PBS-T, membranes were incubated with a secondary anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody and detected using a western blotting luminol reagent. Densitometric analyses were performed by using ImageJ software. The levels of 15-deoxy-Δ¹²,14-prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) in the culture medium were analyzed using the commercial kit (Enzo

Life Sciences) following the manufacturer's protocol. Experiments were repeated minimally three times. All the values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). For multiple comparisons, *p* values were calculated using a one-way analysis of variances (ANOVA) with Tukey's post hoc analysis, where homogeneity of variances was met. Otherwise, Games-Howell post hoc analysis was used.

Results and Discussion

In our study, SMe1EC2 downregulated LPS-elicited proinflammatory iNOS expression (**Fig. 1A, E**) along with a significant increase in 15d-PGJ2 production (**Fig. 1B**) and mild enhancement of the levels of HO-1, an Nrf2-regulated phase II detoxifying enzyme with antioxidant and anti-inflammatory roles (**Fig. 1A, C**). Unpredictably, SMe1EC2 also enhanced the COX-2 levels induced by LPS treatment (**Fig. 1A, D**).

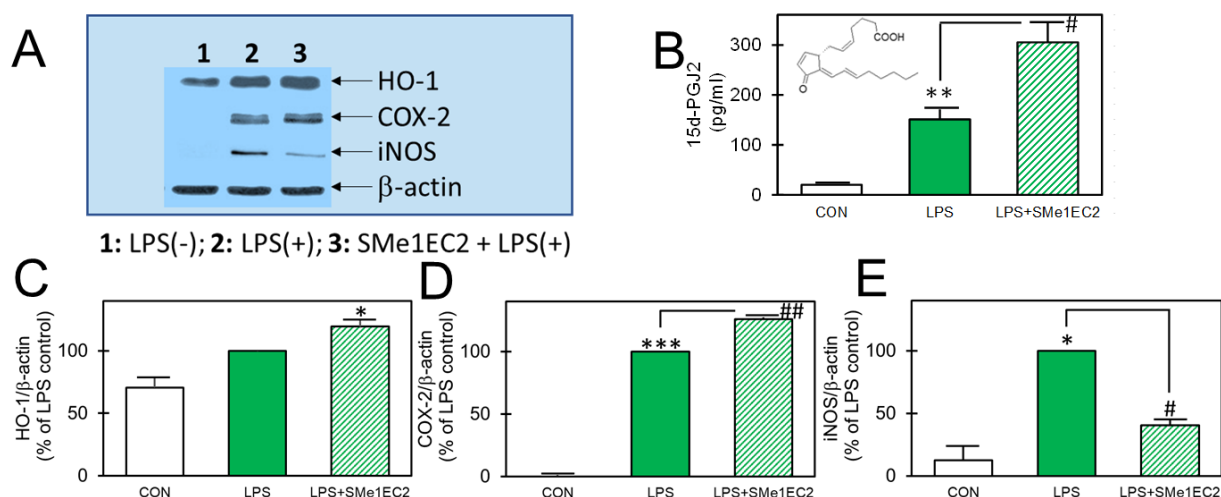


Figure 1. The effect of SMe1EC2 on the expression levels of antioxidant and anti-inflammatory mediators and pro-inflammatory markers in LPS-activated murine BV-2 microglial cells. **A:** Representative Western blots of proteins HO-1, COX-2, and iNOS; **B:** 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15-d-PGJ2) levels measured by ELISA in culture medium. **C, D, E:** Densitometric analysis of proteins. Protein levels were normalized to β -actin. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 vs. control cells, ##*p* < 0.01, #*p* < 0.05 vs. LPS-stimulated cells; LPS – lipopolysaccharide; CON – control.

In a paradox, COX-2 is also a well-accepted mediator of anti-inflammatory processes since it also plays a role in the resolution of inflammation and establishment of the acute inflammatory response [8]. COX-2 has been recognized as a pro-inflammatory enzyme promoting the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2), an essential component of the inflammatory cascade [9]. Nevertheless, COX-2 was found to mediate the intracellular accumulation of 15d-PGJ2, a cyclopentenone PG, which employs its anti-inflammatory activity through activation of

peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) [10, 11] or by directly inhibiting NF κ B activation by binding covalently to the I κ B kinase [12]. Furthermore, COX-2 was shown to activate Nrf2, which in turn regulates the expression of antioxidant enzymes in activated inflammatory macrophages [13, 14]. Moreover, the results of Luo et al., 2015 pointed to a novel role of Nrf2 in inducing COX-2 expression through binding to promoter ARE in the absence of increased ROS in rat preglomerular vascular smooth muscle cells [15].

15d-PGJ2 exerts protective properties in diverse cell systems [16]. It was reported to suppress the p22phox expression to protect against apoptosis of neurons in a PPAR- γ -dependent manner [17]. Also, 15d-PGJ2 induced negative regulator of ROS (NRROS) expression mediated through a PI3K/Akt-dependent FoxO1 and Sp1 phosphorylation and Nrf2 cascade suppressing ROS generation in astrocytes [18].

Thus, the enhancing effect of SMe1EC2 and potentially of other pyridoindole congeners on 15d-PGJ2 release can contribute to restoring intracellular redox homeostasis and suppressing inflammatory processes mediated by activated microglia in the CNS.

Acknowledgments

This contribution originated from the support of Operating Programme *Research and Innovations* for the project „*The study of structural changes of complex glycoconjugates in the process of inherited metabolic and civilization diseases*,” No. ITMS 313021Y920, co-financed by the European Regional Development Fund.

Literature

- [1] Štolc S., Považanec F., Bauer V., Májeková M., Wilcox A. L., Šnirc V., Račková L., Sotníková R., Štefek M., Gáspárová Z., Gajdošíková A., Mihalová D., Alfoldi J. (2005): SK-Pat. 287506, Patent Appl. 1321–2003, Int.Cl. (2010): C07D 471/00, A61K 31/4353, A61P 39/00. = Pyridoindole derivatives with antioxidative properties, their preparation and use in therapeutic practice.
- [2] Štolc, S., Šnirc, V., Májeková, M., Gáspárová, Z., Gajdošíková, A., Stvrtina, S., 2006. Development of the new group of indole-derived neuroprotective drugs affecting oxidative stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26(7-8), 1495-504. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9037-9>
- [3] Gáspárová, Z., Šnirc, V., Štolc, S., 2011. The new pyridoindole antioxidant SMe1EC2 and its intervention in hypoxia/hypoglycemia-induced impairment of longterm potentiation in rat hippocampus. *Interdiscip. Toxicol.* 4(1), 56-61. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0011-0>
- [4] Gáspárová, Z., Ondřejíčková, O., Gajdošíková, A., Gajdošík, A., Šnirc, V., Štolc, S., 2010. Oxidative stress induced by the Fe/ascorbic acid system or model ischemia in vitro: effect of carvedilol and pyridoindole antioxidant SMe1EC2 in young and adult rat brain tissue. *Interdiscip. Toxicol.* 3(4), 122-126. <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0051-x>
- [5] Racková, L., Šnirc, V., Jung, T., Štefek, M., Karasu, C., Grune, T., 2009. Metabolism-induced oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in HT22 neuronal cells. *Free Radic. Res.* 43(9), 876-886. <https://doi.org/10.1080/10715760903104374>

- [6] Mrvová, N., Škandík, M., Bezek, Š., Sedláčková, N., Mach, M., Gaspárová, Z., Luptáková, D., Padej, I., Račková, L., 2017. Pyridoindole SMe1EC2 as cognition enhancer in ageing-related cognitive decline. *Interdiscip. Toxicol.* 10(1), 11-19. <https://doi.org/10.1515/intox-2017-0002>
- [7] Bezek, Š., Brnoliaková, Z., Sotníková, R., Knezl, V., Paulovičová, E., Navarová, J., Bauer, V., 2017. Monotherapy of experimental metabolic syndrome: I. Efficacy and safety. *Interdiscip. Toxicol.* 2017, 10(3), 81-85. <https://doi.org/10.1515/intox-2017-0013>
- [8] Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A., 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 5(6), 698-701. <https://doi.org/10.1038/9550>
- [9] Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104(1), 15-29. <https://doi.org/10.1002/path.1711040103>
- [10] Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B., 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 391(6662), 82-86. <https://doi.org/10.1038/34184>
- [11] Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K., 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391(6662), 79-82. <https://doi.org/10.1038/34178>
- [12] Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., Santoro, M.G., 2000. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature.* 403(6765), 103-108. <https://doi.org/10.1038/47520>
- [13] Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., Yamamoto, M., 2004. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2). *Mol. Cell Biol.* 24(1), 36-45. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.1.36-45.2004>
- [14] Itoh, K., Yamamoto, M., 2005. Regulatory Role of the COX-2 Pathway in the Nrf2-Mediated Anti-Inflammatory Response. 37, 9-18. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.37.9>
- [15] Luo, Y., Welch, W.J., Wilcox, Ch.S., 2015. Abstract 122: Activation of Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) Enhances Cyclooxygenase 2 Expression via Promoter Antioxidant Response Element in Preglomerular Vascular Smooth Muscle Cells (PGVSMCs). *Hypertension.* 66, A122. https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/hyp.66.suppl_1.122
- [16] Abdo, H., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., Lardeux, B., 2012. The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J Physiol.* 590, 2739-50. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222935>
- [17] Wu, J.S., Tsai, H.D., Cheung, W.M., Hsu, C.Y., Lin, T.N., 2016. PPAR- γ Ameliorates Neuronal Apoptosis and Ischemic Brain Injury via Suppressing NF- κ B-Driven p22phox Transcription. *Mol Neurobiol.* 53(6), 3626-3645. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9294-z>
- [18] Wang, CY, Yang, CC, Hsiao LD, Yang, CM, 2022. Involvement of FoxO1, Sp1, and Nrf2 in Upregulation of Negative Regulator of ROS by 15d-PGJ2 Attenuates H2O2-Induced IL-6 Expression in Rat Brain Astrocytes. *Neurotox Res.* 40(1),154-172. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00318-6>

Vplyv molekúl striebra na rastovú krivku *E. coli*

Miroslav Rajninec^{1,2}, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹

¹ Chemický ústav SAV, v. v. i.; Dúbravská cesta 5807/9; 845 38 Bratislava; Slovenská republika

² Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, v. v. i.; Ústav genetiky a biotechnológií rastlín; Akademická 2; 950 07 Nitra, Slovenská republika

Úvod

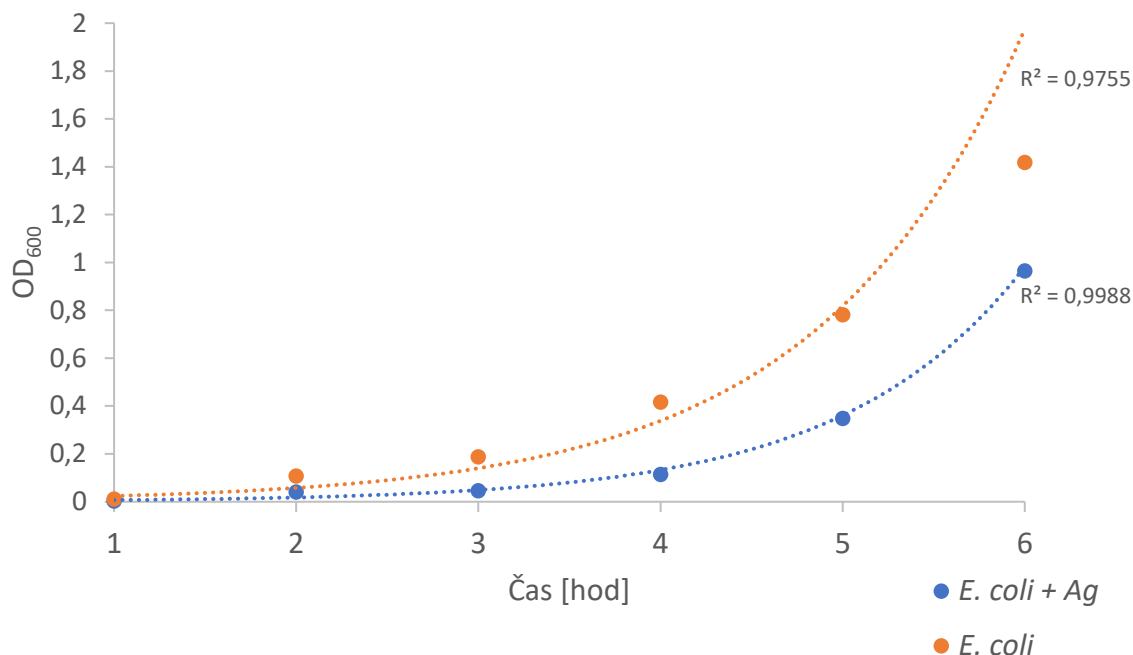
Antimikrobiálny efekt striebra (Ag) je dobre známy už viac ako 2000 rokov (Wesley, 2009). V súčasnosti sa ako veľmi perspektívna cesta v boji proti mikroorganizmom so zvýšenou rezistenciou proti antibiotikám ukazuje práve využívanie produktov s obsahom striebra, pričom striebro bolo zakomponované vo viacerých zdravotníckych komerčne dostupných produktoch (Percival et al., 2005; Sievert et al., 2013). Veľmi aktuálnou sa stala otázka ochrany zdravia populácie proti vírusu Coronavirus SARS-CoV-2, kedy prvé výsledky naznačili, že aplikáciou striebra na ochranné pomôcky sa dosiahol značný virucídny efekt (Balagna et al., 2020). Aplikčné metódy striebra na zdravotnícky materiál, prípadne na veľmi často exponovaný materiál vo verejných priestoroch, so sebou prinášajú otázku možnej nežiadúcej nadmernej expozície striebra do prostredia, čo by mohlo viesť k environmentálnym dopadom. Medzi najnebezpečnejšie môžeme zaradiť už popísaný efekt zvýšenej rezistencie baktérií proti striebru (Graves et al., 2015). S cieľom objasniť antimikrobiálny efekt striebra na rast mikroorganizmov a sledovať jeho dávku nevyhnutnú pre zachytenie inhibičného efektu sme v štúdií ako modelový organizmus využili gram-negatívnu baktériu *Escherichia coli* (*E. coli*). Materiál, na ktorom boli aplikované molekuly striebra pomocou metódy High Target Utilization Sputtering (HiTUS) (Mwema et al., 2021), bol kokultivovaný s baktériami *E. coli*, pričom sa sledovali rozdiely v rastových krivkách spôsobené prítomnosťou striebra, čo následne umožnilo kvantitatívne vyjadrenie inhibičného efektu pripraveného materiálu.

Materiál a metódy

V práci bola ako modelový organizmus využitá gram-negatívna baktéria *Escherichia coli* DH5αF' / gyrA96 (Nal^r) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 (r_k-m_k⁺) glnV44 deoR Δ(*lacZYA*-argF) U169 [Φ80dΔ(*lacZ*)M15] (Woodcock et al., 1989). Baktérie boli kultivované v tekutom LB médiu [1% (w/v) peptón; 0,5% (w/v) kvasničný autolýzát; 1,5% (w/v) NaCl] pri 37°C s trepaním pri 180 rpm počas noci. Následne bola nočná kultúra inokulovaná do nového LB média a kultivovaná do OD₆₀₀ 0,08 – 0,12 (0,5 MFU). Takto pripravená suspenzia buniek bola pridaná do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky s testovaným materiálom (kremíková platnička 5*8 s nanoseným striebrom), prípadne s kontrolným materiálom (kremíková platnička 5*8 mm) vo finálnej koncentrácii 1,5 * 10⁶ buniek/ml a finálnom objeme 300 µl. Meranie optickej denzity (OD₆₀₀) prebiehalo každú hodinu (1 – 6 hodín), v minimálne 3 biologických replikátoch.

Výsledky a diskusia

V práci sme sa zamerali na potvrdenie antibakteriálneho efektu molekúl striebra aplikovaných na kremíkovú platničku metódou HiTUS prostredníctvom zostrojenia rastových kriviek *E. coli*, pričom táto metóda bola použitá na stanovenie antimikrobiálneho efektu vo viacerých publikovaných prácach (Bao et al., 2015; Priester et al., 2014; Geethalakshmi a Sarada, 2013). Koncentrácia baktérií v tekutom LB médiu (OD_{600}) bola monitorovaná priebežne počas 6 hodín kultivácie každú hodinu (Obr. 1).



Obr.1: Rastová krivka *E. coli* v prítomnosti kremíkovej platničky s povlakom striebra (rad *E. coli* + Ag) a bez striebra (rad *E. coli*).

Inhibičný efekt bolo možné preukázateľne zachytiť už po jednej a dvoch hodinách inkubácie, kedy sa vplyv prítomnosti striebra prejavil spomalením prírastku biomasy o približne 60%. Možno povedať, že v tomto čase sa *E. coli* nachádzala v *lag*-fáze bunkového cyklu, kedy ešte nedochádza k výraznému deleniu buniek baktérií (Bertrand, 2019). Všeobecne uznávaná charakteristika *lag*-fázy bunkového cyklu hovorí o spustení adaptačných mechanizmov baktérií v novom prostredí a tiež o tom, že baktérie sú počas *lag*-fázy metabolicky aktívne (Rolfe et al., 2012). Publikované štúdie popisujú, že vplyvom stresu spôsobeného prítomnosťou striebra sa bunky baktérií často dostávajú do tzv. ABNC štádia (active but nonculturable), čoho výsledkom je absencia schopnosti prejsť do exponenciálnej fázy rastu (Jung et al., 2008). Pri meraní optickej hustoty po 3 a 4 hodinách inkubácie možno pozorovať, že baktérie v prostredí bez striebra postupne prechádzajú do exponenciálnej fázy rastu, avšak v prípade v prítomnosti striebra je prírastok biomasy o približne 75% nižší. K celkovému prechodu do ABNC fázy však nedochádza a časť

buniek si zachováva schopnosť deliť sa. Pri 5 a 6 hodinách kultivácie sa bunky v prítomnosti striebra začínajú výraznejšie deliť a aj v prítomnosti striebra dochádza k prechodu do exponenciálnej fázy rastu. Inhibícia prírastku biomasy medzi baktériami v prostredí s obsahom striebra a bez neho sa znižuje pri 5 hodinách na 55% a pri 6 hodinách na 32%. Merané hodnoty sa postupne dostávajú nad 1, takže sa blížia ku kvantifikačnému limitu metódy merania.

Na základe týchto zistení možno pozorovať, že vplyvom prítomnosti striebra v nastavených podmienkach prostredia sa *lag*-fáza bunkového cyklu *E. coli* predlžuje, pričom sa pravdepodobne samotná maximálna špecifická rýchlosť rastu výrazne nemení. Podobné zistenie bolo už pri *E. coli* publikované (Haque et al., 2017). Túto hypotézu bude potrebné overiť sledovaním vitality baktérií v prostredí s obsahom striebra.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj nanoštrukturovaných povlakov s inaktivačným účinkom na vírusy a baktérie pre rôzne typy flexibilných materiálov, ITMS: 313011AUH4, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Alexander, J. Wesley. 2009. History of the Medical Use of Silver. In *Surgical Infections*, vol. 10, no. 3, p. 289–292. Dostupné na: <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941>
- Balagna, Cristina - Perero, Sergio - Percivalle, Elena - Nepita, Edoardo Vecchio - Ferraris, Monica. 2020. Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating. In *Open Ceramics*, vol. 1, , p. 100006. Dostupné na: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.oceram.2020.100006>
- Bao, Huijing - Yu, Xiaoxu - Xu, Chen - Li, Xue - Li, Zhaoyang - Wei, Dianjun - Liu, Yunde. 2015. New Toxicity Mechanism of Silver Nanoparticles: Promoting Apoptosis and Inhibiting Proliferation. In *PLOS ONE*, vol. 10, no. 3, p. e0122535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122535>
- Bertrand, L. Robert. 2019. Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. In *Journal of Bacteriology*, vol. 201, no. 7, p. e00697-18. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/JB.00697-18>
- Graves, Joseph L. - Tajkarimi, Mehrdad - Cunningham, Quincy - Campbell, Adero - Nonga, Herve - Harrison, Scott H. - Barrick, Jeffrey E. 2015. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 6). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00042>
- Haque, Mohammad A. - Imamura, Riku - Brown, George A. - Krishnamurthi, Venkata R. - Niyonshuti, Isabelle I. - Marcelle, Tiffany - Mathurin, Leanne E. - Chen, Jingyi - Wang, Yong. 2017. An experiment-based model quantifying antimicrobial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. In *RSC Advances*, vol. 7, no. 89, p. 56173–56182. Dostupné na: <https://doi.org/10.1039/C7RA10495B>
- Jung, Woo Kyung - Koo, Hye Cheong - Kim, Ki Woo - Shin, Sook - Kim, So Hyun - Park, Yong

- Ho. 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 7, p. 2171–2178. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>
- Mwema, Frederick Madaraka - Akinlabi, Esther Titilayo - Oladijo, Oluseyi Philip. 2021. *Sputtered Thin Films: Theory and Fractal Descriptions*. CRC Press.
- Percival, S. L. - Bowler, P. G. - Russell, D. 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. In *Journal of Hospital Infection*, vol. 60, no. 1, p. 1–7. Dostupné na: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.11.014>
- Priester, John H. - Singhal, Aditi - Wu, Binghui - Stucky, Galen D. - Holden, Patricia A. 2014. Integrated approach to evaluating the toxicity of novel cysteine-capped silver nanoparticles to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In *Analyst*, vol. 139, no. 5, p. 954–963. Dostupné na: <https://doi.org/10.1039/C3AN01648J>
- R., Geethalakshmi - D.V.L., c. 2013. Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. In *Industrial crops and products: Vol. v. v. 51*. Elsevier B.V.
- Rolfe, Matthew D. - Rice, Christopher J. - Lucchini, Sacha - Pin, Carmen - Thompson, Arthur - Cameron, Andrew D. S. - Alston, Mark - Stringer, Michael F. - Betts, Roy P. - Baranyi, József - Peck, Michael W. - Hinton, Jay C. D. 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. In *Journal of Bacteriology*, vol. 194, no. 3, p. 686–701. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Sievert, Dawn M. - Ricks, Philip - Edwards, Jonathan R. - Schneider, Amy - Patel, Jean - Srinivasan, Arjun - Kallen, Alex - Limbago, Brandi - Fridkin, Scott. 2013. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. In *Infection Control & Hospital Epidemiology*, vol. 34, no. 1, p. 1–14. Dostupné na: <https://doi.org/DOI: 10.1086/668770>
- Woodcock, D. M. - Crowther, P. J. - Doherty, J. - Jefferson, S. - DeCruz, E. - Noyer-Weidner, M. - Smith, S. S. - Michael, M. Z. - Graham, M. W. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. In *Nucleic Acids Research*, vol. 17, no. 9, p. 3469–3478. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>

Inhibičný efekt nanočastíc striebra proti vláknitej mikroskopickej hube *Trichoderma harzianum*

Miroslav Rajninec^{1,2}, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹

¹ Chemický ústav SAV, v. v. i.; Dúbravská cesta 5807/9; 845 38 Bratislava; Slovenská republika

² Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, v. v. i.; Ústav genetiky a biotechnológií rastlín; Akademická 2; 950 07 Nitra, Slovenská republika

Úvod

Otázka zvyšovania rezistencie vláknitých mikroskopických fytopatogénnych húb proti komerčne dostupným fungicídnym prípravkom sa v súčasnosti stáva veľmi aktuálnou (Goffeau, 2008). Preto je hľadanie nových alternatívnych prístupov ich kontroly a zneškodnenia perspektívnou cestou výskumu nových materiálov. Moderné techniky prípravy nanoštruktúrnych materiálov so zvýšenou antifungálnou aktivitou sú z tohto hľadiska sľubným kandidátom štúdia v danej oblasti. Jedinečné vlastnosti nanomateriálov, najmä nárast pomeru povrchu štruktúry k celkovému objemu, v porovnaní s antimikrobiálnymi agensmi vo forme iónov alebo solí, vedú častokrát k výraznému zvýšeniu antifungálneho potenciálu (Kanhed et al., 2014). Nanočastice striebra (AgNP) sa vyznačujú vysokou chemickou stabilitou a boli viackrát využité vo viacerých oblastiach priemyslu ako antimikrobiálne agensy (Necula et al., 2009; Bernardo-Mazariegos et al., 2019). Antifungálny efekt AgNP je závislý od mnohých faktorov, akými sú koncentrácia striebra, čas expozície, veľkosť nanočastíc, morfológia fytopatogénnej vláknitej mikroskopickej huby. Pri vysokých dávkach striebra, ktoré by sa mohlo uvoľniť do životného prostredia môže dôjsť aj k negatívnemu ovplyvneniu prospešnej mikrobioty (Vera-Reyes et al., 2022). Zníženie koncentrácie striebra môže byť efektívnou cestou vytvárania produktov určených na ochranu zdravia ľudí a potravín (Zhao et al., 2021). Cieľom štúdie bola charakteristika troch typov pripravených nanočastíc striebra s rôznou intenzitou expozície striebra na nosnú kremíkovú štruktúru so zameraním na popísanie ich inhibičného vplyvu na kľúčiacu spóru vláknitej mikroskopickej huby *Trichoderma harzianum* v *in vitro* podmienkach.

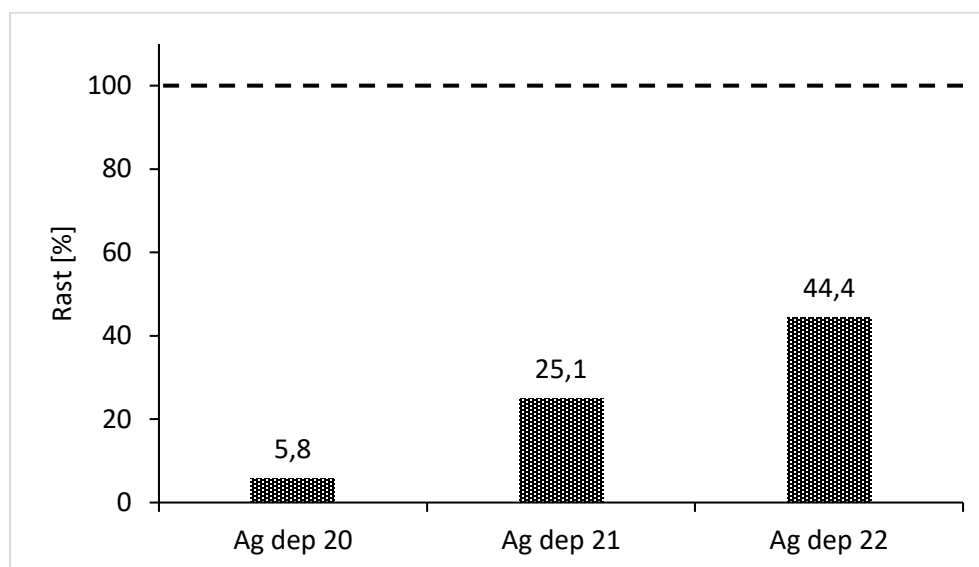
Materiál a metódy

Vláknitá mikroskopická huba *Trichoderma harzianum* CCM F-340 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno) bola kultivovaná na zemiakovo-dextrózovom pevnom alebo tekutom médiu (potato dextrose agar/broth; PDA/PDB) [2% glukóza, 20% zemiakový extrakt, pH 5,6; v prípade PDA 2% agar] (Mac Faddin, 1985). Po dvoch týždňoch kultivácie na PDA pri 25°C boli izolované spóry, ktoré boli inokulované do 300 µl PDB s testovaným materiálom vo finálnej koncentrácii 10⁵ spór/ml. Kultivácia prebiehala v 96-jamkovej mikrotitračnej platničke s testovaným materiálom (kremíková platnička 5*8 s nanoseným striebrom), prípadne s kontrolným materiálom (kremíková platnička 5*8 mm). Kokultivácia s testovaným materiálom prebiehala pri 25°C a 130 rpm počas 18 hodín. Po 18 hodinách kokultivácie bol meraný prírastok biomasy (OD₆₀₀). Test inhibície rastu bol realizovaný v 3 biologických replikátoch.

Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo zhodnotenie antifungálneho potenciálu pripravených nanoštruktúrnych materiálov s obsahom striebra ukotvených na kremíkovej matrici proti vlákniťej mikroskopickkej hube *Trichoderma harzianum*.

AgNP boli pripravené pomocou klastrovacieho zdroja, pričom rozdiel medzi vzorkami bol vo výkonovom nastavení Ag terča. Pri najnižšom nastavení výkonu 50 W (vzorka Ag dep 22) bolo možné pozorovať inhibičný efekt na prírastok biomasy vlákniťej mikroskopickkej hube *Trichoderma harzianum* na úrovni približne 55%. Zvýšením výkonu na Ag terči na 100 W (vzorka Ag dep 20) a 200 W (vzorka Ag dep 21) sa preukázateľne zvýšila aj efektivita inhibície, kedy bola v porovnaní s kontrolnou vzorkou zaznamenaná inhibícia 94% (Ag dep 20), resp. 74% (Ag dep 21) (Obr. 1). Možno konštatovať, že rozdiely v spôsobe prípravy kremíkových platničiek s AgNP preukázateľne ovplyvňujú antifungálne vlastnosti pripravenej nanočasticovej vrstvy, čo koreluje s už publikovanými štúdiami vplyvu AgNP na fytopatogénne huby (Mahdizadeh *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2021). Pri vzorkách Ag dep 20 a Ag dep 21 úroveň inhibičnej aktivity nekorešponduje s nastavením výkonu na Ag terči. Dôvodom tohto rozdielu je pravdepodobne rozdielna úroveň dostupných AgNP, ktoré môžu priamo reagovať s kľúčiacimi spórmi *Trichoderma harzianum* (Panáček *et al.*, 2009).



Obr.1: Rast vlákniťej mikroskopickkej hube *Trichoderma harzianum* v prítomnosti kremíkových platničiek s povlakom striebra pripravených tromi depozičnými metódami (Ag dep 20 – Ag dep 22) v porovnaní s kontrolnou vzorkou (100% rast).

Zistené rozdiely v efektivite inhibície prírastku biomasy vlákniťej mikroskopickkej hube *Trichoderma harzianum* možno jednoznačne pripísať rozdielom v príprave vrstvy AgNP. Možno konštatovať, že pri zachovaní konštantnej plochy s nanesenými AgNP sa zvyšuje úroveň inhibície so zvyšovaním výkonu klastrovacieho zdroja na Ag terči. Najvyššiu úroveň inhibície možno sledovať pri 100 W nastavení Ag terča. Zvýšením výkonu na 200 W sa efektivita inhibície znížila, čo s veľkou pravdepodobnosťou spôsobilo zníženie dostupných AgNP schopných reagovať so spórmi *Trichoderma harzianum* (Bocate *et al.*, 2019).

Na základe získaných dát o inhibičnom efekte pripravených AgNP na kremíkových platničkách môžeme odporučiť využitie pripravenej vzorky Ag dep 20 s cieľom testovania inhibície ďalších významných patogénnych vláknitých mikroskopických hubách.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj nanoštrukturovaných povlakov s inaktivačným účinkom na vírusy a baktérie pre rôzne typy flexibilných materiálov, ITMS: 313011AUH4, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Bernardo-Mazariegos, Erick - Valdez-Salas, Benjamín - González-Mendoza, Daniel - Abdelmoteleb, Ali - Tzintzun Camacho, Olivia - Ceceña Duran, Carlos - Gutiérrez-Miceli, Federico. 2019. Silver nanoparticles from Justicia spicigera and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. In Revista Argentina de Microbiología, vol. 51, no. 2, p. 103–109. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.05.002>
- Bocate, Karla Paiva - Reis, Guilherme Fonseca - de Souza, Patricia Canteri - Oliveira Junior, Admilton G. - Durán, Nelson - Nakazato, Gerson - Furlaneto, Márcia Cristina - de Almeida, Ricardo Sérgio - Panagio, Luciano Aparecido. 2019. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of Aspergillus. In International Journal of Food Microbiology, vol. 291, , p. 79–86. Dostupné na: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.012>
- Goffeau, André. 2008. The fight against fungi. In Nature, vol. 452, no. 7187, p. 541–542. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/452541a>
- Kanhed, Prachi - Birla, Sonal - Gaikwad, Swapnil - Gade, Aniket - Seabra, Amedea B. - Rubilar, Olga - Duran, Nelson - Rai, Mahendra. 2014. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. In Materials Letters, vol. 115, , p. 13–17. Dostupné na: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.10.011>
- Mac Faddin, Jean F. 1985. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*. Baltimore (Md.) : Williams and Wilkins. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:000079718>
- Mahdizadeh, Valiollah - Safaie, Naser - Khelghatibana, Fatemeh. 2015. Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and Trichoderma harzianum TT -. In Mdrsjrns, vol. 4, no. 3, p. 291–300. <http://jcp.modares.ac.ir/article-3-12407-en.html>
- Necula, Bogdan S. - Fratila-Apachitei, Lidy E. - Zaat, Sebastian A. J. - Apachitei, Iulian - Duszczuk, Jurek. 2009. In vitro antibacterial activity of porous TiO₂-Ag composite layers against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. In Acta Biomaterialia, vol. 5, no. 9, p. 3573–3580. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.05.010>
- Panáček, Aleš - Kolář, Milan - Večeřová, Renata - Pucek, Robert - Soukupová, Jana - Kryštof, Vladimír - Hamal, Petr - Zbořil, Radek - Kvítek, Libor. 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp. In Biomaterials, vol. 30, no. 31, p. 6333–6340. Dostupné

na: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>

Vera-Reyes, Ileana - Altamirano-Hernández, Josué - Reyes-de la Cruz, Homero - Granados-Echegoyen, Carlos A. - Loera-Alvarado, Gerardo - López-López, Abimael - Garcia-Cerda, Luis A. - Loera-Alvarado, Esperanza. 2022. Inhibition of Phytopathogenic and Beneficial Fungi Applying Silver Nanoparticles In Vitro. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 23). Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/molecules27238147>

Zhao, Xixi - Wang, Kai - Ai, Chongyang - Yan, Lu - Jiang, Chunmei - Shi, Junling. 2021. Improvement of antifungal and antibacterial activities of food packages using silver nanoparticles synthesized by iturin A. In *Food Packaging and Shelf Life*, vol. 28, , p. 100669. Dostupné na: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100669>

Stanovenie obsahu uvoľneného striebra metódou ICP-OES a jeho vplyv na antibakteriálny potenciál

Miroslav Rajnínec^{1,2}, Marián Tomka³, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹

¹ Chemický ústav SAV, v. v. i.; Dúbravská cesta 5807/9; 845 38 Bratislava; Slovenská republika

² Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, v. v. i.; Ústav genetiky a biotechnológií rastlín; Akademická 2; 950 07 Nitra, Slovenská republika

³ Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76, Nitra, Slovenská republika

Úvod

V dôsledku zvyšovania rezistencie patogénnych mikroorganizmov proti konvenčným antibiotickým preparátom je podľa Svetovej zdravotníckej organizácie hľadanie alternatív ochrany verejného zdravia jednou z najakútnejších otázok výskumu v tejto oblasti. Striebro je dobre známym antimikrobiálnym agensom, pričom v kombinácii s dostupnými modernými metódami jeho aplikácie na rôzne bežne využívané materiály je možné dosiahnuť sľubné výsledky v boji proti patogénom so zvýšenou rezistenciou voči antibiotikám (Bruna *et al.*, 2021). Mechanizmus interakcie striebra s mikroorganizmom je postupnou kaskádou procesov vedúcich k celovému kolapsu bunky. Pri kontakte dochádza najprv k blokácii respirácie, elektrónového transferu a protónovej pumpy mikroorganizmu. Disrupcia bunkovej membrány následne umožňuje prechod striebra do cytoplazmy bunky, kde dochádza k ďalšiemu poškodeniu formovaním komplexov striebra s nukleovými kyselinami, tiolovými skupinami enzýmov a k zvýšenej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (Gordon *et al.*, 2010; Mijndonckx *et al.*, 2013). Jednou z otázok širšej využiteľnosti striebra je jeho možná environmentálna toxicita a akumulácia v prostredí. Z tohto dôvodu je nutné presné stanovenie obsahu striebra potrebného k dostatočnej biologickej kontrole patogénneho organizmu pri súčasnej najvyššej možnej eliminácii prípadných negatívnych vplyvov na prostredie či zdravie človeka. Iba presné analytické metódy sú schopné poskytnúť informácie o koncentrácií striebra, keď je jeho zastúpenie v testovanej vzorke veľmi nízke (Iglesias a Torrent, 2021). Metóda optickej emisnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (ICP-OES) umožňuje rýchle, rutinné a najmä reprodukovateľné výsledky stanovenia obsahu striebra a ďalších zložiek v analyzovanej vzorke (Sásková *et al.*, 2016; Rezić *et al.*, 2022).

V práci sme sa zamerali na stanovenie obsahu uvoľneného striebra metódou ICP-OES z pripravených vzoriek pomocou magnetronu a tiež zhodnotenie ich inhibičného potenciálu proti gram-negatívnej baktérii *E. coli*.

Materiál a metódy

V práci bola ako modelový organizmus využitá gram-negatívna baktéria *Escherichia coli* DH5 α F' / gyrA96 (Nalr) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 (rk-mk+) glnV44 deoR Δ (lacZYA-argF) U169 [Φ 80d Δ (lacZ)M15] (Woodcock *et al.*, 1989). Baktérie boli kultivované v tekutom LB médiu [1% (w/v) peptón; 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát; 1,5% (w/v) NaCl] pri 37°C s trepaním pri 180 rpm počas noci. Následne bola nočná kultúra inokulovaná do nového LB média a kultivovaná do OD₆₀₀ 0,08 – 0,12 (0,5 MFU). Takto pripravená suspenzia buniek bola pridaná do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky s testovaným materiálom (kremíková platnička/polypropylénová vrstva 5*8 s naneseným striebrom), prípadne s kontrolným materiálom (kremíková platnička/polypropylénová vrstva 5*8 mm) vo finálnej koncentrácii 1,5 *10⁶ buniek/ml a finálnom objeme 300 μ l. Meranie optickej denzity (OD₆₀₀) bolo realizované po 3 hodinách, v minimálne 3 biologických replikátoch.

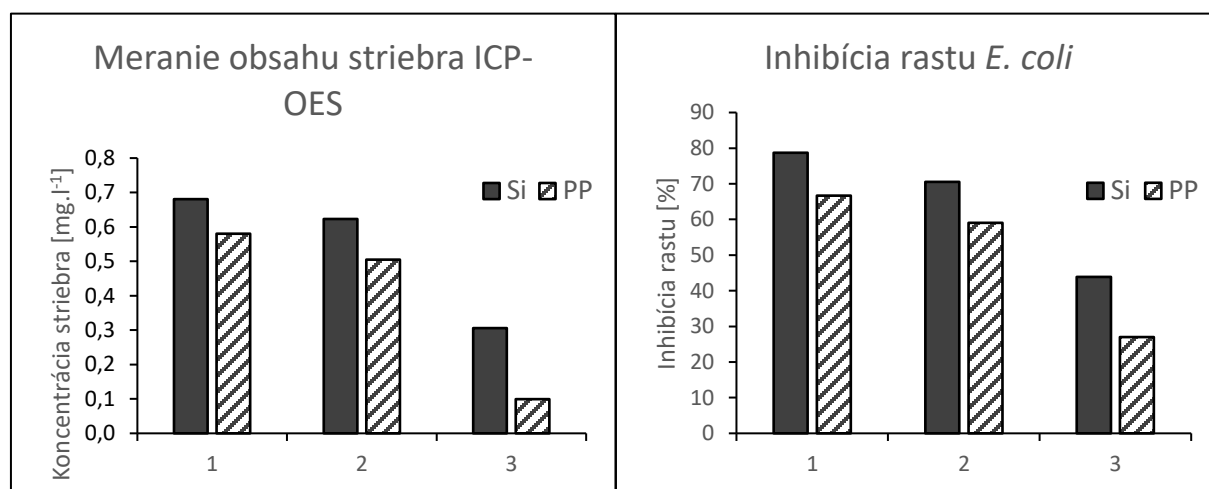
Analýzy koncentrácie striebra v jednotlivých vzorkách sa uskutočňovali s pomocou optického emisného spektrofotometra ICP Thermo ICAP 7000 Dual (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), ktorý využíva indukčne viazanú plazmu. Na kalibráciu sa použil štandardný roztok striebra (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švajčiarsko) s koncentráciami striebra 49,7 mg.L⁻¹; 4,97 mg.L⁻¹; 0,497 mg.L⁻¹ a 0,0497 mg.L⁻¹. Na základe zostrojenej kalibračnej krivky boli automaticky vyrátané koncentrácie striebra v analyzovaných vzorkách.

Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo zhodnotiť obsah uvoľneného striebra pomocou metódy ICP-OES a inhibičný potenciál antimikrobiálnej vrstvy pripravenej technológiou magnetron upevnenej na kremíkovom (Si) a polypropylénovom (PP) nosiči. Na základe získaných dát bolo možné pozorovať rozdiely v obsahu striebra aj v inhibičnej efektívite v závislosti od typu použitého nosiča a dĺžky expozície pri príprave vzoriek (Tian *et al.*, 2013). Vzorka č. 1 pripravená 100 s expozíciou podľa očakávaní pri ICP-OES meraniach vykázala najvyšší obsah striebra 0,680 mg.L⁻¹ pre kremíkový nosič a 0,580 mg.L⁻¹ pre polypropylénový nosič. Inhibičná aktivita rastu *E. coli* sa pohybovala na pri kremíkovom nosiči na úrovni 79% a pri polypropylénovom nosiči na úrovni 67%. Zníženie času expozície pri príprave vzorky č. 2 na 60s viedlo aj k zníženiu obsahu nameraného striebra na 0,620 mg.L⁻¹ (Si) resp. na 0,505 mg.L⁻¹ (PP). Potlačenie rastu *E. coli* sa taktiež znížilo na 71% (Si), resp. 59% (PP), tento pokles však nebol preukazný. Viaceré štúdie potvrdili, že inhibičný účinok je závislý najmä od tvaru pripravených častíc (Gao *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2010). Ak sa pri vzorkách nemení technológia prípravy, ale len čas expozície, možno očakávať vysokú závislosť inhibičného účinku najmä od koncentrácie striebra (Cheon *et al.*, 2019). V prípade expozície 22 s pri príprave vzorky č. 3 sa namerané hodnoty obsahu striebra pomocou ICP-OES pohybovali úrovni 0,306 mg.L⁻¹ (Si) resp. na 0,100 mg.L⁻¹ (PP). Inhibičný efekt pripravených materiálov sa preukázateľne znížil na úroveň 44% (Si), resp. 27% (PP) (Obr. 1). Možno tiež sledovať trend zníženej miery uvoľňovania striebra pri všetkých vzorkách aplikovaných na polypropylénovom nosiči, čo s veľkou pravdepodobnosťou možno pripísať zvýšenej odolnosti vrstvy aplikovanej na flexibilnom materiáli pri inkubácii s trepaním (Ghorbani a Molaei, 2017).

Porovnaním obsahu uvoľneného striebra a inhibičnou efektívitou medzi vzorkami pripravenými rozdielnou dobou expozície možno zhodnotiť, že zníženie doby expozície na 60 s nemalo preukázateľný vplyv ani na schopnosť inhibície, ani na mieru uvoľňovania striebra. Zníženie

expozície na 22 s viedlo k najmä pri polypropylénovom nosiči k výraznému zníženiu inhibičnej aktivity. Na základe tohto zistenia možno odporučiť 60 s interval prípravy vrstvy s cieľom dosiahnutia optimálneho pomeru množstva aplikovaného striebra a inhibičného potenciálu materiálu. Zníženie expozície na 22 s viedlo k najmä pri polypropylénovom nosiči k výraznému zníženiu inhibičnej aktivity. Na základe tohto zistenia možno odporučiť 60 s interval prípravy vrstvy s cieľom dosiahnutia optimálneho pomeru množstva aplikovaného striebra a inhibičného potenciálu materiálu.



Obr.1: ICP-OES meranie obsahu striebra a inhibičný efekt testovaných vzoriek na rast *E. coli*. Si – vrstva striebra na kremíkovej platničke, PP – vrstva striebra na polypropylénovom nosiči. 1 – expozícia na Ag terči 100 s, 2 – expozícia na Ag terči 60 s, 3 – expozícia na Ag terči 22 s

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj nanoštrukturovaných povlakov s inaktivačným účinkom na vírusy a baktérie pre rôzne typy flexibilných materiálov, ITMS: 313011AUH4, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Bruna, Tamara - Maldonado-Bravo, Francisca - Jara, Paul - Caro, Nelson. 2021. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 13). Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- Cheon, Ja Young - Kim, Su Jun - Rhee, Young Ha - Kwon, Oh Hyeong - Park, Won Ho. 2019. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. In *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14, , p. 2773–2780. Dostupné na: <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>
- Gao, Minjie - Sun, Lei - Wang, Zhiqiang - Zhao, Yanbao. 2013. Controlled synthesis of Ag nanoparticles with different morphologies and their antibacterial properties. In *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, no. 1, p. 397–404. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.005>

- Ghorbani, Hamid Reza - Molaei, Mazaher. 2017. Antibacterial nanocomposite preparation of polypropylene-Silver using Corona discharge. In *Progress in Organic Coatings*, vol. 112, , p. 187–190. Dostupné na: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.07.020>
- Gordon, Oliver - Vig Slenters, Tünde - Brunetto Priscilla, S. - Villaruz Amer, E. - Sturdevant Daniel, E. - Otto, Michael - Landmann, Regine - Fromm Katharina, M. 2010. Silver Coordination Polymers for Prevention of Implant Infection: Thiol Interaction, Impact on Respiratory Chain Enzymes, and Hydroxyl Radical Induction. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, no. 10, p. 4208–4218. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/AAC.01830-09>
- Iglesias, Mònica - Torrent, Laura. 2021. Silver Nanoparticles and Ionic Silver Separation Using a Cation-Exchange Resin. Variables Affecting Their Separation and Improvements of AgNP Characterization by SP-ICPMS. In *Nanomaterials* (Vol. 11, Issue 10). Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/nano11102626>
- Liu, Wei - Wu, Yuan - Wang, Chang - Li, Hong C. - Wang, Thanh - Liao, Chun Y. - Cui, Lin - Zhou, Qun F. - Yan, Bing - Jiang, Gui B. 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. In *Nanotoxicology*, vol. 4, no. 3, p. 319–330. Dostupné na: <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.483745>
- Mijnendonckx, Kristel - Leys, Natalie - Mahillon, Jacques - Silver, Simon - Van Houdt, Rob. 2013. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. In *BioMetals*, vol. 26, no. 4, p. 609–621. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9645-z>
- Rezić, Iva - Škoc, Maja S. - Majdak, Mislav - Jurić, Slaven - Stracenski, Katarina S. - Vlahoviček-Kahlina, Kristina - Vinceković, Marko. 2022. ICP-MS Determination of Antimicrobial Metals in Microcapsules. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 10). Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/molecules27103219>
- Sásková, Denisa - Pořízka, Jaromír - Kulich, Pavel - Španová, Alena - Diviš, Pavel - Rittich, Bohuslav. 2016. Silver Nanoparticles Production with Probiotic Bacteria. In *Materials Science Forum*, vol. 851, , p. 32–36. Dostupné na: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.851.32>
- Tian, Ligang - Wang, Pingli - Zhao, Zhiguo - Ji, Junhui. 2013. Antimicrobial Activity of Electrospun Poly(butylenes succinate) Fiber Mats Containing PVP-Capped Silver Nanoparticles. In *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 171, no. 7, p. 1890–1899. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0461-2>
- Woodcock, D. M. - Crowther, P. J. - Doherty, J. - Jefferson, S. - DeCruz, E. - Noyer-Weidner, M. - Smith, S. S. - Michael, M. Z. - Graham, M. W. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. In *Nucleic Acids Research*, vol. 17, no. 9, p. 3469–3478. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>

Antivírusový efekt striebra na niektoré modelové vírusové kmene

Andrea Gažiová^{1,2}, Mária Šedivá¹, Ján Mucha¹

¹ Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika

² Úrad verejného zdravotníctva, Trnavská cesta 52, 826 45 Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Počas pandémie ochorenia COVID-19 spôsobenej koronavírusom SARS-CoV-2 a jeho transmisiiu v spoločnosti sa stalo nevyhnutnosťou riešiť otázku spojenú s dezinfekciou povrchov, zariadení, ako aj ochranných pomôcok. Za účelom spomalenia prenosu respiračných ochorení bolo vykonaných už viacero štúdií, ktoré sa zaoberali antimikrobiálnym účinkom komplexu striebra a oxidu kremičitého [1]. Technológia prípravy povrchov bola patentovaná a využíva sa pri biomedicínskych implantátoch [2], prírodných a technických textíliách [3,4], či filtroch [5]. Balagna a kol. [6] popísali aplikáciu striebra na medicínske ochranné pomôcky, pričom bol dosiahnutý značný virucídny efekt. Štúdia testujúca účinok nanočastíc striebra proti vírusu chrípky A (H1N1) potvrdila jeho antivírusový účinok [7].

V predloženej štúdii sa sledoval antivírusový účinok strieborných častíc pripravených pomocou metódy High Target Utilization Sputtering (HiTUS) [8] proti niektorým modelovým vírusom.

Materiál a metódy

Bunková kultúra, propagácia vírusov a sledovanie antivírusového účinku

Na stanovenie antivírusového účinku bola použitá RD(A) bunková línia- derivovaná z malígneho embryonálneho rhabdomyosarkómu kultivovaná v Eaglovom minimálnom esenciálnom médiu s L-glutamínom. Na stanovenie TCID₅₀ bolo použité riedenie 10⁻⁹ vírusových častíc.

Použité vírusy: Enterovírusy- čeľaď *Picornaviridae*, genóm tvorí jednovláknová (ss) RNA

- Poliovírus typ 1
- Poliovírus typ 3
- Vírus coxsackie A7

Suspenzia vírusových častíc bola vystavené účinku strieborných povlakov typ Ag 1, Ag 5 a Ag 6 [8] v rôznych časových intervaloch - 30, 60, 90 minút. Následne, vírusová suspenzia bola nanesená na bunkové kultúry, ktoré sa inkubovali v šikmých kultivačných skúmavkách v šikmom stojane pod 5° uhlom plochou-kultivačnou stranou smerom dole. Bunkové kultúry boli sledované po dobu 5 dní až do prirodzeného rozpadu buniek a vyšetrené v minimálne dvoch pasážach. Do ďalšej pasáže boli skúmavky z predchádzajúcej kultivácie uchovávané pri teplote -20° C ±3° C. Ku každej bunkovej kultúre s inokulovanou vírusovou suspenziou bola zaradená negatívna kontrola (čistá bunková monovrstva) a pozitívna kontrola vírusu (vitálny vírus na bunkovej monovrstve).

Výsledky a diskusia

Testované strieborné povlaky Ag 1, Ag 5 aj Ag 6 vykázali inhibičný účinok na selektovaných vírusových kultúrach. Vírusové kultúry Polio typ 1 aj Polio typ 3 boli citlivé na prítomnosť strieborných povlakov už po 30 minútovej expozícii a inhibičný efekt bol pozorovaný rovnako aj pri 60 a 90 minútovej expozícii pri oboch testovaných bunkových pasážach.

Podobne aj kultúra vírusu Cocksackie bola citlivá na všetky 3 typy testovaných strieborných povlakov. V prvej bunkovej pasáži bola pozorovaná neporušená bunková vrstva, t.j. vírus bol inaktivovaný po všetkých expozíciách striebra, ale v druhej bunkovej pasáži už bol pozorovaný cytopatický efekt CPE po 30 minútovej expozícii. Po 60 a 90 minútovej expozícii už cytopatický efekt pozorovaný nebol, vírus bol inaktivovaný (Tab.1. a Tab.2).

Tabuľka 1

Vírus	Čas vystavenia vírusov účinku strieborných povlakov		
	30 minút	60 minút	90 minút
Poliovírus typ 1	-	-	-
Poliovírus typ 3	-	-	-
Cocksackie vírus	-	-	-

Hodnotenie antivírusového účinku strieborných povlakov na vírusové kultúry po 30, 60 a 90 minútovej expozícii v prvej pasáži: + (tvorba CPE, bez inhibičného účinku Ag), - (bez CPE, inhibičný účinok Ag)

Tabuľka 2

Vírus	Čas vystavenia vírusov účinku strieborných povlakov		
	30 minút	60 minút	90 minút
Poliovírus typ 1	-	-	-
Poliovírus typ 3	-	-	-
Cocksackie vírus	+	-	-

Hodnotenie antivírusového účinku strieborných povlakov na vírusové kultúry po 30, 60 a 90 minútovej expozícii v druhej pasáži: + (tvorba CPE, bez inhibičného účinku Ag), - (bez CPE, inhibičný účinok Ag)

Podobne ako v už publikovaných štúdiách aj v našich experimentoch sme potvrdili schopnosť striebra inaktivovať niektoré vírusové kmene, konkrétne Poliovírus typ 1, Poliovírus typ 3 a Cocksackie vírus. Antivírusový účinok strieborných molekúl nanesených na kremíkový povrch metódou HiTUS je porovnateľný s inými metódami prípravy strieborných nanoštruktúr [7]. Získané výsledky naznačujú možnosti využitia tejto technológie a potenciál strieborných nanoštruktúr inaktivovať ďalšie významné patogénne vírusové kmene.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj nanoštrukturovaných povlakov s inaktivačným účinkom na vírusy a baktérie pre rôzne typy flexibilných materiálov, ITMS: 313011AUH4, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

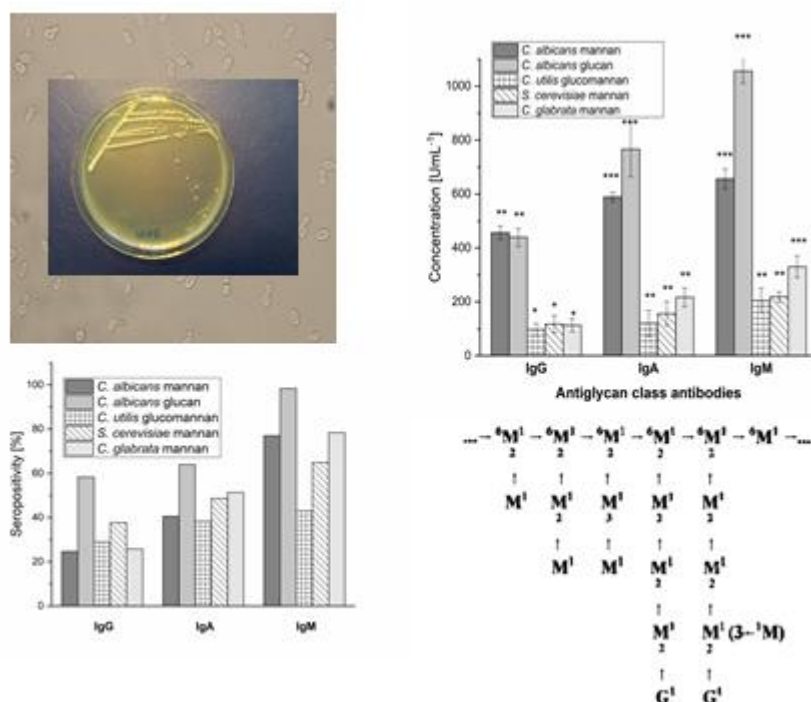
- [1] Ferraris M., Perero S., Miola M., Ferraris S., Gautier G., Maina G., Fucale G., Verné E. Chemical, mechanical, and antibacterial properties of silver nanocluster– silica composite coatings obtained by sputtering. *Adv. Eng. Mater.* 2010;12:B276–B282. doi: 10.1002/adem.200980076.
- [2] Muzio G., Perero S., Miola M., Oraldi M., Ferraris S., Verné E., Festa F., Canuto R.A., Festa V., Ferraris M. Biocompatibility versus peritoneal mesothelial cells of polypropylene prostheses for hernia repair, coated with a thin silica/silver layer. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2016;105:1586–1593. doi: 10.1002/jbm.b.33697
- [3] Irfan M., Perero S., Miola M., Maina G., Ferri A., Ferraris M., Balagna C. Antimicrobial functionalization of cotton fabric with silver nanoclusters/silica composite coating via RF co-sputtering technique. *Cellulose.* 2017;24:2331–2345. doi: 10.1007/s10570-017-1232-y.
- [4] Balagna C., Irfan M., Perero S., Miola M., Maina G., Santella D., Simone A. Characterization of antibacterial silver nanocluster/silica composite coating on high performance Kevlar® textile. *Surf. Coating. Technol.* 2017;321:438–447. doi: 10.1016/j.surfcoat.2017.05.009.
- [5] Balagna C., Perero S., Bosco F., Mollea C., Irfan M., Ferraris M. Antipathogen nanostructured coating for air filters. *Appl. Surf. Sci.* 2020;508 doi: 10.1016/j.apsusc.2020.145283. 145283.
- [6] Balagna C., Perero S., Percivalle, E., Nepita, E.V., Ferraris, M. Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/ silica composite sputtered coating. *Open Ceramics.* 2020; doi: 10.1016/j.oceram.2020.100006.
- [7] Xiang D., Chen Q., Pang L., Zheng C. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *J. Virol. Methods.* 2011;178:137–142. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.09.003.
- [8] Izai, V., Fiantok, T., Vidiš, M., Truchlý, M., Satrapinskyy, L., Nagy, Š., Roch, T., Turiničová, V., Kúš, P., Mikula, M. Structure and chemical composition of thin-film nanocomposites based on silver in organosilicon amorphous matrix prepared by High Target Utilization Sputtering. *Thin Solid Films*, 2023, 765, 139643. doi.org/10.1016/j.tsf.2022.139643.

Antibody-mediated immune responses against rare facultative pathogen *Candida utilis* in atopic patients with vulvovaginal candidiasis. Glucomannan as a new serologic biomarker

Ema Paulovičová¹, Martin Hrubisko²

¹Immunol. & Cell Culture Labs, Dept. Glycoconjugate Immunochemistry, Center for Glycomics, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

²Dept.Clin.Immunol.and Allergy, Oncology Institute of St. Elisabeth and Slovak Medical University, Bratislava, Slovakia



Introduction

Vulvovaginal candidiasis is one of the most commonly reported female genital tract infections, affecting approximately 70–75% of childbearing age women at least once during their lifetime. The fungal cell wall represents the important host-invader interface. Cell-wall polysaccharides represent biological response modifiers and the pathogen-associated molecular patterns and virulence factors. The most dominant cell-wall antigenic structures of *Candida* species as β -glucan, α - and β -mannans, glucomannan and other immunogenic polysaccharides are of particular relevancy for specific *in vitro* diagnosis and long-term follow-up of the *Candida* infection. The vaginal mycobiome represents the part of human mycobiome and covers approx. 0.1% of all fungal constituents of total human microbiome. Approximately 75% of women suffer at least one episode of vulvovaginal candidiasis in their life and approximately 40-50% experienced a recurrence. In general, the factors associated with vaginal colonisation and developing of vulvovaginal candidiasis are multifactorial i.e. changes in the physiological mucosal flora, dysbiosis,

pregnancy, active sexual life, systemic or intravaginal antibiotics therapy, oral contraceptive usage, estrogen therapy, hormone replacement therapy, diabetes mellitus type 2, cystic fibrosis, HIV, systemic immunosuppression, deteriorated local cell immunity, secondary and primary immunodeficiency, decrease of mannose binding lectin, allergy/atopy. (Sobel,2007; Denning et al.,2018; Hrubisko et al.,2003; Faria-Gonçalves, 2020; Gonçalves, 2016; Krüger et al., 2019; Hall and Noverr, 2017, Lines et al.2020, Ardizzoni et al.,) Recently, the studies of genetic predisposition to vulvovaginal candidiasis revealed polymorphism in the SIGLEC15 gene that was associated with RVVC (Jaeger et al.,2019). The relationship between polymorphism in the NLRP3 gene, higher production of IL-1 α , low IL-1Ra levels and persistent hyperinflammatory state in RVVC patients has been studied (Rosati et al. 2020). Next, the association between Dectin-1 deficiency (Ferwerda et al.,2009), mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism (Wojitani et al., 2012; Nedovic et al., 2014), and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism (Wojitani et al., 2012) and RVVC has been mentioned. The relationship between atopy/allergy and RVVC has been suggested by Bernstein (Bernstein et al., 2015) and Dondores (Dondores et al., 2018), based on the hypothesis that vulvovaginal candidiasis is an allergic reaction to the ability of *Candida*-specific IgE and prostaglandin E2 to inhibit vaginal cell-mediated immune response (Bernstein et al., 2015).

In this study we assessed the immunobiological activity of facultative pathogen *Candida utilis* cell glucomannan and its effectivity as *in vitro* serological marker for antibody testing. The novel serologic assay has been developed and optimized for *C. utilis* serodiagnosis. The comparison assays were performed to establish relationship between antibodies against *C. utilis*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* main cell-wall antigens in patient sera.

Material and methods

The serological assays were performed in a patient cohort comprising 35 female participants (31.3 ± 5.2 years) with atopy and a history of recurrent vaginal mycosis (Department of Clinical Immunology and Allergy, Oncology Institute of St. Elisabeth, Bratislava, Slovakia).

Yeast strains *C. glabrata* CCY 26-20-1, *C. albicans* CCY 29-3-32, *S. cerevisiae* CCY 21-4-13 and *C. utilis* CCY 29-38-18 (all from Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak *C. glabrata* CCY 26-20-1, *C. albicans* CCY 29-3-32, *S. cerevisiae* CCY 21-4-13 cellular mannans were prepared and analysed as previously published (Peat, et al., 1961), *C. utilis* CCY 29-38-18 glucomannan has been isolated and characterised by Kogan et al. (Kogan et al.,1993). *C. albicans* glucan was also obtained from Dr. Kogan.

ELISA assay and determination of specific anti-*C. utilis* CCY 29-38-18 glucomannan, anti-*C. albicans* CCY 29-3-32 mannan and glucan, anti-*C. glabrata* CCY 26-20-1 mannan and anti-*S. cerevisiae* CCY 21-4-13 mannan IgG, IgM and IgA antibodies were modified based on diagnostic kits Biogema a.s. Kosice.

Results and discussion

The present study reports the evaluation of unconventional opportunistic pathogen *C. utilis* cell wall glucomannan as serodiagnostic antigen and inducer of antigen specific antibody isotypes in

the cohort of atopic female subjects with recurrent *Candida vulvovaginitis*. Statistically significant sera values of specific anti-glycan IgM and IgA class antibodies were revealed. The results are suggestive for efficient serological application of *C. utilis* glucomannan as in vitro disease marker and prospectively for follow-up of the specific long-term antimycotic therapy. Generally, the highest values within the concentration range have been determined for anti-glycan specific isotypes IgM and IgA, followed by specific IgG (Table 1). Specific IgM anti-*C. albicans* mannan and β -glucan and anti-*C. glabrata* mannan exerted high degree of statistical significance ($P < 0.001$), while sera values of specific IgM anti-*S. cerevisiae* mannan and anti-*C. utilis* glucomannan were lower, although statistically significant ($P < 0.01$). Next most profound reactive isotype has been IgA anti-*C. albicans* mannan and β -glucan ($P < 0.001$), IgA anti-*C. glabrata* while anti-*S. cerevisiae* mannan and *C. utilis* glucomannan were produced to a lesser extent ($P < 0.01$). The specific IgG anti-*C. albicans* mannan and β -glucan sera levels have been lower in comparison with IgM and IgA isotypes ($P < 0.01$). The determination of specific IgG anti-*C. glabrata* and anti-*S. cerevisiae* mannan and *C. utilis* glucomannan demonstrated the lowest levels of anti-glycan antibodies ($P < 0.05$). Evaluation of distribution of positive results revealed the majority of positive results over normal reference interval with IgM isotype antibodies against *C. albicans* β -glucan and mannan, *C. glabrata* mannan, to lesser degree in the case of *S. cerevisiae* mannan and *C. utilis* glucomannan (Figure 1 and 2).

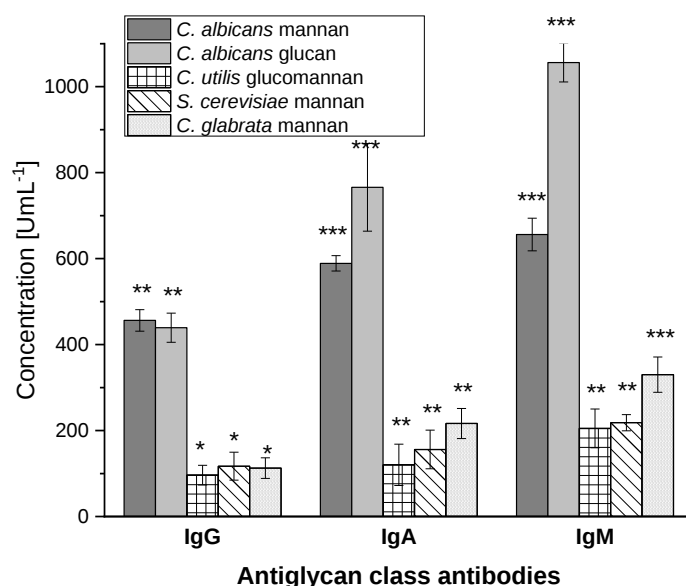


Fig.1. Serological profile of antiglycans IgG, IgA and IgM class antibodies. All data are presented as Mean $\pm$ 3SD. Serological tests were assayed in duplicate. Statistical significance of differences (*one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni's test*) is expressed as: *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$.

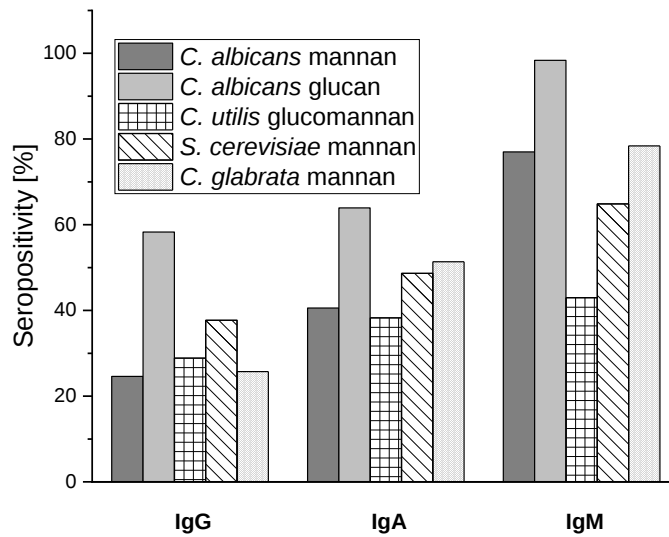


Fig.2. Distribution of positive results of glycan-specific IgG, IgM and IgA class antibodies in study population. *The cut-off values for diagnostic tests were calculated according to blood donors' IgG/IgM/IgA anti-glycan antibodies' values (average $\pm$ 3SD).*

Tab.1. Concentration range (min and max values (U/mL⁻¹)) of specific anti-*C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae*, and *C. utilis* anti-glycan IgG, IgM and IgA antibodies in patient cohort.

	<i>C. albicans</i> mannan		<i>C. albicans</i> β -glucan		<i>C. utilis</i> glucomannan		<i>S. cerevisiae</i> mannan		<i>C. glabrata</i> mannan	
IgG	48.08	930.2	64.3	720.3	35.2	210.3	41.8	288.2	31.7	418.2
IgA	53.54	1211.5	38.2	1851	25.8	268.1	34.7	332	32.6	559.3
IgM	47.63	3652.3	40.7	3177.6	38.6	480.2	45.2	383	45.3	603.2

Antibody mediated antifungal immunity is engaged in protection against fungal pathogens and consequently against fungi-mediated local or systemic inflammation. As mentioned before, the main etiological agent of fungal vulvovaginal mycoses *C. albicans* accounts for 80-95% of all episodes of vulvovaginal candidiasis. The increase of non-albicans spp. (Mushi et al., 2019), and participation of the

other yeasts as *S. cerevisiae* has been demonstrated (Sobel et al., 1993, Holland et al., 2003). Generally, the specific antibodies against critical fungal cell virulence factors might play important protective or therapeutic role. Several mechanisms of effective antibody protection as direct neutralization of fungi and fungal cell antigens, growth inhibition capacity, inhibition of exopolysaccharide cell release and biofilm formation were reviewed (Elluru et al., 2015). Antibodies are engaged in process of opsonophagocytosis, activation of complement cascade and participate in antibody-dependent cytotoxicity. Moreover, antifungal antibodies have an important role in immunomodulation and in preventing inflammation-mediated tissue damage (Casadevall and Pirofski, 2003 and 2012; Lionakis et al., 2017).

The serologic analysis of anti-glycan antibodies in a cohort of atopic females with episodes of mycotic colpitis revealed, that the highest concentrations of anti-glycan antibodies are of IgM isotype, followed by IgA class antibodies (Figure 1, Table 1). Highest values resulted principally for *C. albicans* β -glucan, followed by mannan, this order could be presumably associated with re-arrangement of β -glucan masking in the cell wall of *C. albicans* following morphoforms switch from yeast to filamentous growth associated with infection and β -glucan exposure (Goodridge et al., 2009). As concerned seropositivity (Figure 2) the majority of positive results over normal reference interval is observed with IgM isotype antibodies against *C. albicans* β -glucan and mannan, followed by *C. glabrata*, to lesser extent in the case of *S. cerevisiae* mannan and *C. utilis* glucomannan (Table 1). The seropositivity of IgA isotype antiglycan antibodies reflected IgM trend. Detection of serum specific IgA antibodies to *C. albicans* in parallel with specific IgG in women with recurrent genital candidiasis has been evaluated (Tasic et al., 2003). The anti-*Candida* β -glucan and mannan and *Saccharomyces* mannan specific IgM prevalence in different patient cohorts with vulvovaginal mycosis was previously reported (Paulovicova et al. 2015; Paulovicova et al., 2017; Paulovicova et al., 2019). The increased specific IgM anti-mannan isotype antibodies over IgG-anti mannan isotype antibodies were recorded in candidemia patients (Meng et al., 2020).

Acknowledgments

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project Study of structural changes of complex glycoconjugates in the process of inherited metabolic and civilization diseases, ITMS: 313021Y920, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

- Ardizzoni, A., Wheeler, R.T., Pericolini, E.(2021). It Takes Two to Tango: How a Dysregulation of the Innate Immunity, Coupled With *Candida* Virulence, Triggers VVC Onset. *Front Microbiol.* 12:692491. doi: 10.3389/fmicb.2021.692491.
- Bernstein, J.A., and Seidu L. (2015). Chronic vulvovaginal *Candida* hypersensitivity: An underrecognized and undertreated disorder by allergists. *Allergy Rhinol* (Providence). 6, 44-9. [https:// doi: 10.2500/ar.2015.6.0113](https://doi.org/10.2500/ar.2015.6.0113)
- Denning, D.W., Kneale, M., Sobel, J.D., and Rautemaa-Richardson, R. (2018). Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 18, E339-E347. doi.org/10.1016/S1473-3099(18)301103-8
- Elluru SR, Kaveri SV, Bayry J. The protective role of immunoglobulins in fungal infections and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2015 Mar;37(2):187-97. doi: 10.1007/s00281-014-0466-0.

Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spruel AB, Venselaar H, Elbers CC, Johnson MD, Cambi A, Huysamen C, Jacobs L, Jansen T, Verheijen K, Masthoff L, Morré SA, Vriend G, Williams DL, Perfect JR, Joosten LA, Wijmenga C, van der Meer JW, Adema GJ, Kullberg BJ, Brown GD, Netea MG. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med*. 2009 Oct 29;361(18):1760-7. doi: 10.1056/NEJMoa0901053.

Faria-Gonçalves, P., Rolo, J., Gaspar, C., Oliveira, A.S., Pestana, P.G., Palmeira-de-Oliveira, R., et al. (2020). Recurrent vulvovaginal *Candida* spp isolates phenotypically express less virulence traits. *Microb Pathog*. 148, 104471. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104471

Goodridge, H.S., Wolf, A.J., and Underhill, D.M. (2009). Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*. 230, 38-50. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2009.00793.x

Hrubiško, M., Paulovičová, E., and Vargová H. (2003). Chronic colitis: immunological profile and treatment. In: Marone G (Ed). *Clinical Immunology and Allergy in Medicine*, Chapter 87. Naples, Italy: JGC Editions 589-594.

Jaeger, M., Pinelli, M., Borghi, M., Constantini, C., Dindo, M., van Emst, L., et al. (2019). A systems genomics approach identifies *SIGLEC15* as a susceptibility factor in recurrent vulvovaginal candidiasis. *Sci Transl Med*. 11, eaar3558. doi: 10.1126/scitranslmed.aar3558

Krüger, W., Vielreicher, S., Kapitan, M., Jacobsen, I.D., and Niemiec, M.J. (2019). Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease. *Pathogens*. 8, 70. doi:10.3390/pathogens8020070

Meng, Y., Kang, M., Li, D., Wang, T., Kuang, Z., & Ma, Y. (2020). Performance of a new *Candida* anti-mannan IgM and IgG assays in the diagnosis of candidemia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062025>

Paulovičová, E., Bujdaková, H., Chupáčová, J., Paulovičová, L., Kertys, P., and Hrubiško M. (2015). Humoral immune responses to *Candida albicans* complement receptor 3-related protein in the atopic subjects with vulvovaginal candidiasis. Novel sensitive marker for *Candida* infection. *FEMS Yeast Res*. 15, fou001. doi: 10.1093/femsyr/fou001

Paulovičová, E., Paulovičová, L., Hrubiško, M., Krylov, V.B., Argunov, D.A., and Nifantiev, N.E. (2017). Immunobiological Activity of Synthetically Prepared Immunodominant Galactomannosides Structurally Mimicking *Aspergillus* Galactomannan. *Front Immunol*. 8:1273. doi:10.3389/fimmu.2017.01273

Paulovičová, L., Paulovičová, E., Farkaš, P., Čížová, A., Bystrický, P., Jančinová, V., et al. (2019). Bioimmunological activities of *Candida glabrata* cellular mannan. *FEMS Yeast Res*. 19, foz009. doi.org/10.1093/femsyr/foz009

Seed P. C. (2014). The human mycobiome. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 5, a019810. doi.org/10.1101/cshperspect.a019810

Sobel, J.D. (2007). Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 369, 1961-71. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60917-9

Wojtani, M.D.K.H., de Aguiar, L.M., Baracat, E.C. and Linhares, I.M. (2012). Association between mannose-binding lectin and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and recurrent vulvovaginal candidiasis. *Arch Gynecol Obstet*. 285, 149–153. doi.org/10.1007/s00404-011-1920-z

Príprava a antimikrobiálne vlastnosti kvarternizovaných polysacharidov mikrobiálneho pôvodu

Romana Vrzoňová, Alžbeta Čížová, Jana Mečárová, Slavomír Bystrický

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko

Úvod

Prudký nárast rezistentných patogénnych mikroorganizmov spolu s pomalým vývojom nových antibiotík predstavuje veľké a celosvetovo rastúce zdravotné riziko [1,2]. Náročnou výzvou pre súčasnú vedu je prevencia voči mikrobiálnym infekciám spôsobeným najmä multirezistentnými baktériami, ktoré sú spoločne označované ako ESKAPE patogény (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a druhy rodu *Enterobacter*) [3]. Hlavnou príčinou vzniku a šírenia týchto multirezistentných nozokomiálnych patogénov je intenzívne a dlhodobé, často aj neopodstatnené používanie antibiotík naprieč celým systémom zdravotnej starostlivosti [4].

V posledných rokoch sa ako potenciálne antimikrobiálne materiály začali skúmať kationové polysacharidy [5]. Ich účinnosť závisí od rôznych faktorov, akými sú: druh cieľového mikroorganizmu, hustota náboja, rozpustnosť vo vode a ich veľkosť. Zatiaľ čo štruktúry s nízkou mólou hmotnosťou môžu preniknúť do bakteriálnej bunky, polyméry s vysokou mólou hmotnosťou pravdepodobne vytvárajú film na povrchu bunky, čím inhibujú transport živín [6]. Viacero štúdií potvrdilo antimikrobiálnu aktivitu kvarternizovaného chitozánu a ďalších polysacharidov rastlinného alebo mikrobiálneho pôvodu [7,8].

Cieľom tejto práce bolo pripraviť kvarternizované dextrány rôznej mólavej hmotnosti a študovať ich antibakteriálny účinok voči meticilín rezistentnej gram-negatívnej baktérii *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Materiál a metódy

Dextrány D10 a D500 (Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko), D70 (Biotika, Slovensko) a D2000 (Biosynth Carbosynth, UK) s porovnateľným stupňom vetvenia (3–5%) a rôznymi mólami hmotnosťami sme chemicky modifikovali kvarternizáciou s (3-chloro-2-hydroxypropyl) trimetylamónium chloridom (CHPTAC; 72.0% vodný roztok; TCI, Japonsko) za vodno-alkalických podmienok (NaOH:CHPTAC 1:1; 6 h; 60 °C) do približne rovnakého stupňa kvarternizácie (DS_Q). DS_Q sa stanovil na základe percentuálneho obsahu dusíka (%N) elementárnou analýzou pomocou nasledujúceho vzťahu:

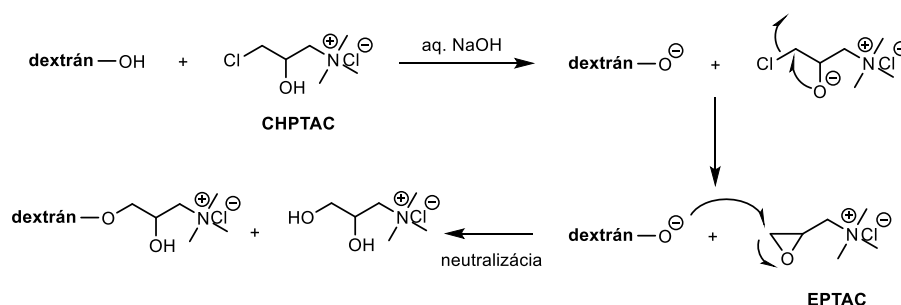
$$DS_Q = (162 \times \%N) / ((14 \times 100) \times (152 \times \%N))$$

Úspešnosť kvarternizácie bola ďalej sledovaná NMR spektroskopiou v D₂O (99.97% D) pri 65 °C pomocou Bruker AVANCE III HD 400 MHz (Bruker BioSpin, Nemecko) NMR spektrometra so širokopásmovou BB-(H-F)-D-05-Z Prodigy sondou chladenou tekutým dusíkom. Spektrá boli nastavené na signál interného acetónového štandardu (2.225 ppm).

Meticilín rezistentný *S. aureus* ZPM 24 (Národné referenčné centrum – Zbierka kultúr patogénnych mikroorganizmov SZU, Slovensko) bol kultivovaný v prítomnosti kvarternizovaných dextránov (1000–7.81 µg/mL). Štandardizovanou mikrodilučnou technikou [8] sa stanovila antibakteriálna aktivita kvarternizovaných dextránov ako minimálna inhibičná (MIC), minimálna baktericídna koncentrácia (MBC) a minimálna koncentrácia inhibície tvorby biofilmu (MBIC).

Výsledky a diskusia

Dextrán je extracelulárny neutrálny vetvený polysacharid produkovaný laktobaktériami ako *Leuconostoc mesenteroides* a je komerčne dostupný v rôznych mólových hmotnostiach. Pozostáva z hlavného reťazca α -1,6-viazanej D-glukózy s rôznym percentom α -1,4-, α -1,3- a α -1,2-viazaných bočných glukózových vetiev v závislosti od konkrétneho kmeňa [9]. Chemickou modifikáciou voľných –OH skupín s CHPTAC (Obr. 1) sme pripravili kvarternizované deriváty s pozitívnym nábojom.



Obr. 1: Reakčný mechanizmus kvarternizácie dextránu zahŕňa tvorbu alkoxidov z –OH skupín dextránu v alkalickom prostredí a ich následnú reakciu s (2,3-epoxypropyl)trimetylamónium chloridom (EPTAC), ktorý sa vytvára *in situ* reakciou CHPTAC s NaOH [10].

Prítomnosť kvartérnej amóniovej skupiny potvrdila elementárna analýza ako aj NMR spektroskopia. V spektrách kvarternizovaných derivátov sa okrem signálov prislúchajúcich dextránu objavili aj nové signály pri 3.23, 3.50, 3.73 a 4.42 ppm patriace deviatim protónom kvartérnej amóniovej skupiny ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), štyrom protónom $\text{–CH}_2\text{–N–}$ a $\text{–O–CH}_2\text{–}$ metylénových skupín a jednému protónu –CHOH– skupiny. Nový signál v anomérnej oblasti pri 5.14 ppm tiež indikuje úspešnosť kvarternizácie. Stupeň kvarternizácie DS_Q sa pohyboval okolo 0,50 (Tab. 1).

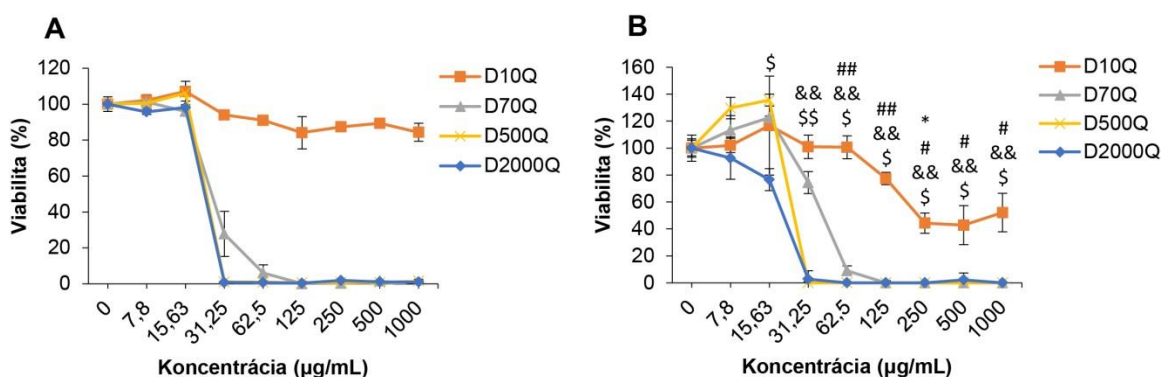
Tab. 1: Výsledky kvarternizácie dextrans rôznych mólových hmotností za vodno-alkalických podmienok (NaOH:CHPTAC 1:1; 6 h; 60 °C) a ich antimikrobiálna účinnosť voči MRSA vyjadrená ako minimálna inhibičná (MIC), minimálna baktericídna koncentrácia (MBC) a minimálna koncentrácia inhibície tvorby biofilmu (MBIC).

Vzorka	M_w (kDa)	CHPTAC/AU ^a (mol/mol)	DS _Q	RU ^b (%)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MBIC (µg/mL)
D10Q	10	8	0,50	6,3	>1000	>1000	>1000
D70Q	76	7	0,52	7,4	125	125	125
D500Q	410	7	0,50	7,2	31,25	31,25	31,25
D2000Q	2000	8	0,49	6,2	31,25	31,25	31,25

^a AU – anhydrosacharidová jednotka

^b Reakčná účinnosť (RU) = $DS_Q / DS_{\text{teor.}} \times 100$, kde DS_Q je stupeň substitúcie a $DS_{\text{teor.}}$ je teoretický stupeň substitúcie, ktorý by bol dosiahnutý v prípade, že všetok CHPTAC zreagoval.

Pripravené kvarternizované dextransy inhibovali rast MRSA v závislosti od mólovej hmotnosti (Tab. 1, Obr. 2A). V prípade derivátu D10Q s najnižšou mólovou hmotnosťou sme v danom koncentračnom rozsahu nezaznamenali minimálnu inhibičnú ani baktericídnu koncentráciu. U derivátov s vyššou mólovou hmotnosťou sa ale inhibičný i baktericídny účinok prejavil, konkrétne pri koncentrácii 125 µg/mL (D70Q) resp. 31,25 µg/mL (D500Q a D2000Q). Podobný trend sme pozorovali aj v prípade inhibície tvorby biofilmu (Obr. 2B). Nemodifikované dextransy nevykazovali žiadnu antibakteriálnu účinnosť bez ohľadu na ich mólovú hmotnosť.



Obr. 2: Výsledky stanovenia viability (A) a inhibície tvorby biofilmu (B) MRSA v prítomnosti kvarternizovaných dextrans rôznych mólových hmotností. Výsledky sú uvedené ako priemer troch stanovení ± smerodajná odchýlka. Štatisticky významné rozdiely vo viabilite (%) vzhľadom k neopracovaným bunkám (100%) sú naznačené príslušnými symbolmi pre jednotlivé deriváty (D10Q: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; D70Q: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$; D500Q: & $p < 0,05$, && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$; D2000Q: \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$).

Vplyv mólovej hmotnosti na antimikrobiálnu aktivitu kationových polysacharidov bol intenzívne študovaný na chitozáne [11]. Publikované práce sú však rozporuplné. Naše výsledky naznačujú, že je potrebná určitá minimálna mólová hmotnosť (>10 kDa), aby boli kvarternizované dextrány antimikrobiálne účinné voči MRSA. Účinok so zvyšujúcou sa mólovou hmotnosťou narastal, až kým nedosiahol svoje maximum (~410 kDa). Ďalšie zvyšovanie mólovej hmotnosti sa už neprejavilo vyššou antibakteriálnou aktivitou. K podobným záverom dospeli aj No a kol. [12] v prípade chitozánu.

Prezentované výsledky sú „odrazovým mostíkom“ pre hlbšie štúdium vzťahu štruktúry kvarternizovaných polysacharidov a ich antimikrobiálneho účinku. Poznanie tohto vzťahu umožní cielenú prípravu účinných biomateriálov na báze polysacharidov vhodných na prevenciu a eradikáciu nozokomiálnych infekcií.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore Vedeckej grantovej agentúry Slovenskej akadémie vied VEGA [projekt č. 2/0076/21] a podpore v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra [ITMS: 313021Y920], spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] A.M. Carmona-Ribeiro, L.D. de Melo Carrasco, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 9906–9946.
- [2] F. Prestinaci, P. Pezzotti, A. Pantosti, *Pathog. Glob. Health* 109 (2015) 309–318.
- [3] L.B. Rice, *J. Infect. Dis.* 197 (2008) 1079–1081.
- [4] J.-L. Vincent, *Lancet* 361 (2003) 2068–2077.
- [5] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, *Int. J. Food Microbiol.* 144 (2010) 51–63.
- [6] P. Eaton, J.C. Fernandes, E. Pereira, M.E. Pintado, F.X. Malcata, *Ultramicroscopy* 108 (2008) 1128–1134.
- [7] W.S. de Almeida, D.A. da Silva, *Int. J. Biol. Macromol.* 182 (2021) 1419–1436.
- [8] J. Valáriková, A. Čížová, L. Račková, S. Bystrický, *Carbohydr. Polym.* 240 (2020) 116288.
- [9] T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, S. Hornig, Functional polymers based on dextran, in: D. Klemm (Ed.), *Polysaccharides II. Adv. Polym. Sci.* 205, Springer Berlin Heidelberg, (2006) 199–291.
- [10] H.J. Prado, M.C. Matulewicz, *Eur. Polym. J.* 52 (2014) 53–75.
- [11] M.E.I. Badawy, E.I. Rabea, *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2011 (2011) 460381.
- [12] H.K. No, N. Young Park, S. Ho Lee, S.P. Meyers, *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65–72.

Porovnanie modelov glykozidtransglykozyáz vytvorených pomocou programov Modeller a AlphaFold

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Úvod

Homológne modelovanie proteínov je výpočtová metóda využívaná na vytvorenie trojdimenzionálneho (3D) modelu proteínu na základe znalosti jeho primárnej štruktúry a experimentálne stanovenej terciárnej štruktúry homológneho proteínu (templátu) [1]. Medzi najčastejšie používaný softvér na homológne modelovanie patrí Modeller [2]. Alternatívu k tomuto prístupu predstavuje napr. AlphaFold [3], ktorý je systémom umelej inteligencie a predikuje 3D štruktúru proteínov z ich aminokyselinovej sekvencie. V tejto práci porovnáme modely glykozidtransglykozyáz vytvorených týmito dvomi softvérmi.

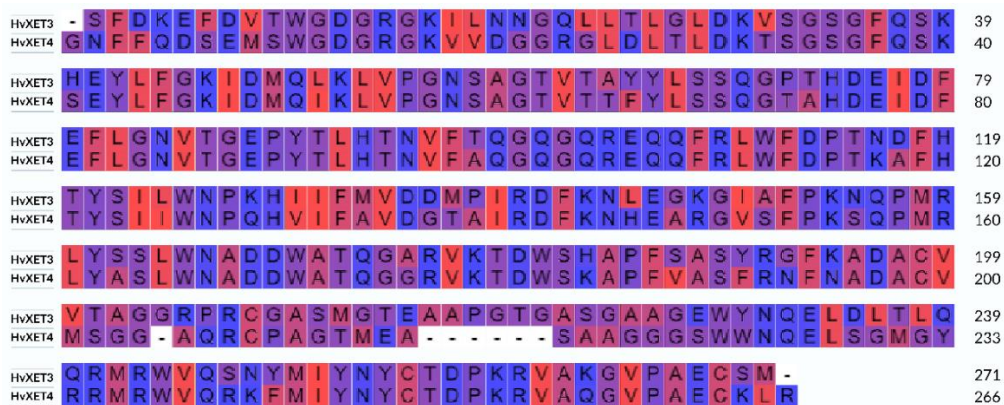
Materiál a metódy

Ako vzorové glykozidtransglykozyázy boli použité dve formy xyloglukánendotransglykozyázy (XET), ktoré sú v databáze UniProtKB [4] uložené pod číslami P93671 a P93672. V tejto práci figurujú enzýmy pod skratkami HvXET3 a HvXET4. Ako templát pre homológne modelovanie bola použitá jediná známa kryštalografická štruktúra XET, 1UN1.pdb [5].

Na vytvorenie homológnych modelov sa použila verzia programov Modeller9v6 [6] a AlphaFold v2 (DeepMind) [3].

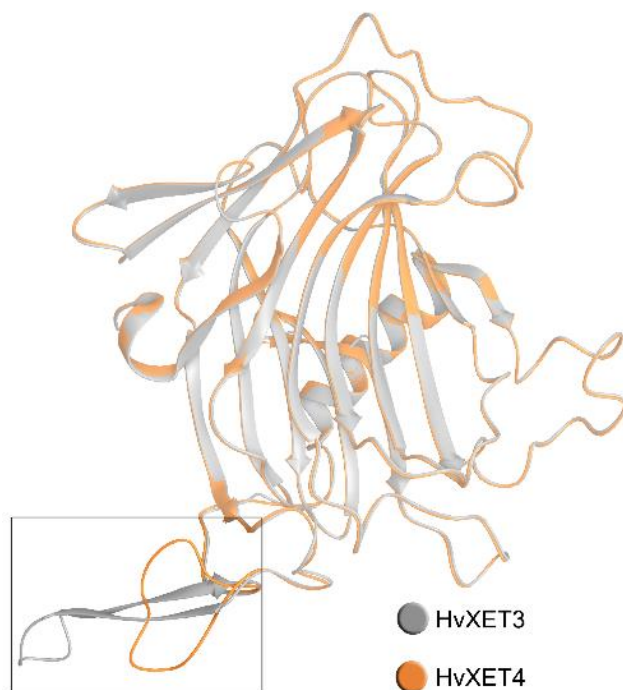
Výsledky a diskusia

Porovnanie primárnych štruktúr HvXET3 a HvXET4 s farebným vyznačením hydrofobicity aminokyselín ukázalo, že najvýraznejší rozdiel medzi týmito izoformami spočíva v rozdielnom počte aminokyselín tvoriacich ich štruktúru (Obr.1), pričom HvXET3 obsahuje viac hydrofóbných aminokyselín.



Obr.1: Zarovnanie primárnych štruktúr HvXET3 a HvXET4 s vizualizáciou hydrofobicity jednotlivých aminokyselín. Hydrofobicita aminokyselín klesá od červenej cez ružovú a fialovú po modrú.

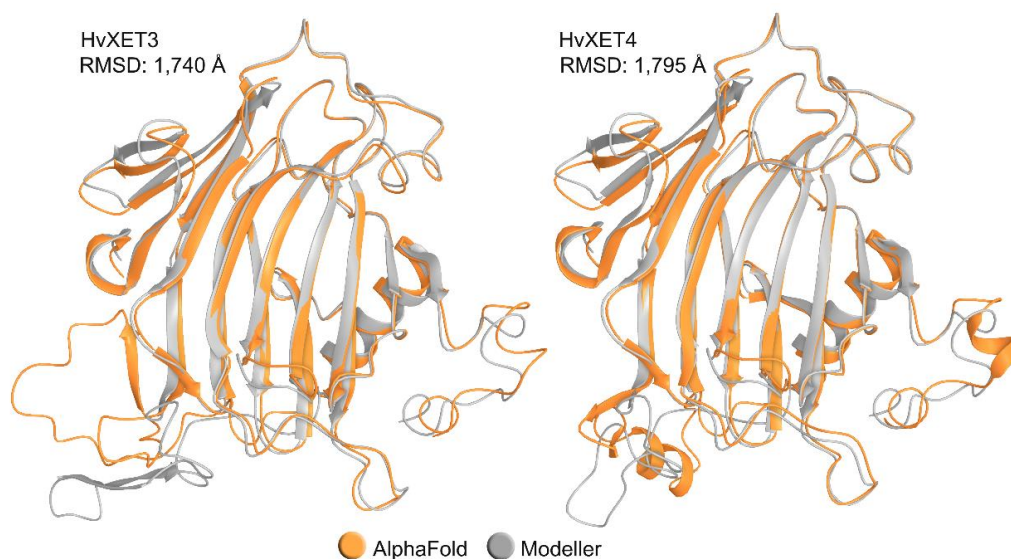
Prekrytie modelov terciálnych štruktúr vytvorených programom Modeller ukázalo, že tento rozdiel by nemal ovplyvňovať štruktúru aktívneho miesta enzýmov, keďže sa nachádza v periférnej oblasti, ktorá je od neho dostatočne vzdialená (Obr.2). Vzhľadom na prítomnosť β -listov v HvXET3 v mieste, kde je HvXET4 skrátaná, by sa mohol do určitej miery prejaviť v stabilite molekúl vystavených rôznym podmienkam.



Obr.2: Prekryv homológnych modelov HvXET3 a HvXET4 vytvorených programom Modeller. V rámečku je vizualizovaná oblasť s najväčšími štrukturálnymi rozdielmi. Aktívne miesto enzýmov je tvorené β -listami, ktorých usporiadanie umožňuje viazanie donorových a akceptorových substrátov.

V ďalšom kroku boli vytvorené modely HvXET3 a HvXET4 programom AlphaFold. RMSD (root means square deviation) medzi týmito modelmi a modelmi vytvorenými pomocou programu Modeller (Obr. 3) bolo približne rovnaké pre HvXET3 (1,740 Å) aj HvXET4 (1,795 Å). Takáto nízka hodnota reprezentuje vysokú podobnosť oboch modelov, pričom vizuálne môžeme sledovať hlavný rozdiel opäť v oblasti s rôznym počtom aminokyselín zvýrazneným na Obr. 2. V prípade HvXET3, kde Modeller naznačil v tejto oblasti určité usporiadanie do β -listov, nechal AlphaFold štruktúru v tejto oblasti neusporiadanú, pokým v prípade HvXET4, v ktorej podľa Modelleru bola táto oblasť neusporiadaná, sa podľa AlphaFoldu objavila α -helikálna štruktúra (Obr. 3). Ďalší skrátaný α -hélix sa objavil v C-terminálovej štruktúre napriek tomu, že v HvXET3 sa takéto usporiadanie neobjavilo.

Experimentálna charakterizácia týchto enzýmov [7] ukázala, že napriek vysokej podobnosti štruktúr (Obr. 1) a biochemických vlastností (identické teplotné a pH optimum) je HvXET3 v porovnaní s HvXET4 menej odolná voči náhlým zmenám teplôt a má o niečo nižšiu pH stabilitu. Toto by mohlo byť zapríčinené práve zamenou neusporiadanej časti štruktúry za α -helikálnu, ktorú navrhol AlphaFold pre HvXET4. Na druhej strane bola HvXET3 o niečo odolnejšia voči vysokým teplotám, čo by sa dalo skôr pripísať jej mierne vyššej hydrofobicite (Obr. 1).



Obr. 3 Prekrytie homológnych modelov HvXET izoformiem vytvorených programami AlphaFold a Modeller.

Záver

Program AlphaFold vytvoril v prípade izoformy HvXET4 α -helikálnu štruktúru, ktorá by mohla prispievať k vyššej stabilite tohto enzýmu voči náhlym zmenám teplôt a k jeho vyššej pH stabilite v porovnaní s HvXET3. Tieto výsledky môžu naznačovať vyššiu presnosť modelov vytvorených AlphaFoldom ako Modellerom. Rozdiely v modeloch sa prejavili výlučne v neusporiadaných oblastiach štruktúr, oblasť aktívneho miesta tvorená sendvičovou štruktúrou zloženou z β -listov a ukončená α -hélixom bola daná kryštalografickou štruktúrou templátu, na základe ktorého pracujú algoritmy oboch programov.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Krieger E., Nabuurs S.B., Vriend G. (2003) Methods Biochem. Anal. 44, 509-523.
- [2] Šali A., Blundell T. (1993) J. Mol. Biol. 234, 779–815.
- [3] Jumper J., Evans R., Pritzel A. a kol. (2021) Nature 596, 583–589.
- [4] The UniProt Consortium (2021) Nucleic Acids Res. 49:D1.
- [5] Johansson P., Brumer H., Baumann M.J. a kol. (2004) Plant Cell 16, 874-886.
- [6] Šali A., Webb B., Madhusudhan M. S. a kol. (2009) Modeller, release 9v6, r6593.
- [7] Stratilová B., Šesták S., Mravec J. a kol. (2020) Plant J. 104, 752-767.

Čiastočná biochemická charakterizácia proteínu UniProtKB Q75XT0

Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

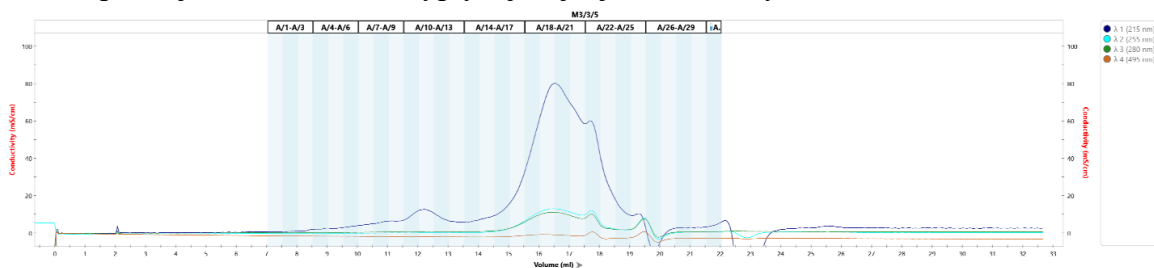
Prudký rozvoj nukleotidových a proteínových databáz spojený s vývojom výpočtovej techniky viedol k významným zmenám v metódach práce s neznámymi bielkovinami, ktorá sa prejavila napr. v čiastočnom nahradení ich komplikovaných purifikácií zo surových prírodných materiálov s cieľom stanoviť ich kompletnú štruktúru a charakteristiky, na prácu s databázami, prípravu syntetických génov a expresiu cieľových proteínov na základe ich čiastočnej biochemickej charakterizácie. Na otestovanie spôsobilosti takejto metódy sme z databázy UniprotKB [1] vybrali proteín Q75XT0, ktorý by mal na základe štruktúry reprezentovať glykozidhydrolázu (GH) z rodiny 28 [2].

Materiál a metódy

Na základe bioinformatickej analýzy [3] sme potvrdili, že hypotetický proteín Q75XT0 vykazuje prítomnosť aminokyselín esenciálnych pre viazanie a hydrolýzu substrátov typických pre enzýmy rodiny GH 28. V databázach sme vyhľadali jeho nukleotidovú štruktúru (ENA, BAC87792), komerčnou cestou dali pripraviť syntetický gén (ProteoGenixSAS) a transformovali ho do *Pichia pastoris* GS115 [4]. Cieľový proteín bol získaný rovnakým postupom ako proteín A0A161ZKU8 [5] a rovnako bol následne čiastočne charakterizovaný. Expresia proteínu Q75XT0 bola v kultivačnom médiu potvrdená hmotnostnou spektrometriou (Orbitrap Elite, ThermoScientific) [6], pričom boli súčasne stanovené kontaminujúce proteíny pochádzajúce z *P. pastoris*.

Výsledky a diskusia

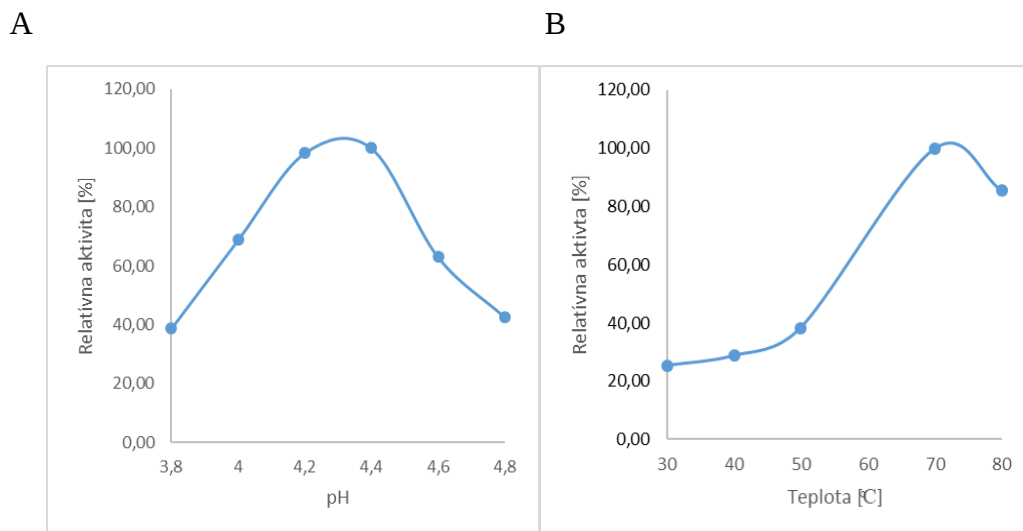
Bioinformatická analýza ukázala, že žiaden z kontaminujúcich proteínov, ktoré pochádzajú z produkčného kmeňa *P. pastoris*, neobsahuje aminokyseliny, ktoré sú esenciálne pre katalytickú aktivitu rodiny GH 28, t.j. nemôže ovplyvňovať výsledky zistené na základe stanovenia enzýmovej aktivity Q75XT0. Proteínový profil prezrážaných proteínov separovaných podľa ich molekulovej hmotnosti (Mh) je zobrazený na **Obr. 1**. Najvyššia enzýmová aktivita sa zistila vo frakcii 12,5 ml, ktorá korešponduje s Mh Q75XT0 vyplývajúcej z jeho štruktúry.



Obr. 1. Proteínový profil prezrážaného kultivačného média na kolóne Superose 1 zapojenej do zariadenia NGC (Bio-Rad).

Stanovenie aktivity na polysacharid a jeho pentamér ukázalo, že aktivita na polysacharid je približne 2,7 x vyššia ako na pentamér. V porovnaní s izoformou A0A161ZKU8 bol tento pomer rádovo nižší, keďže v prípade A0A161ZKU8 bol tento pomer v prospech polyméru vyšší viac ako 20x.

Ďalší rozdiel medzi týmito dvomi formami sa zistil pri stanovení pH optima, ktoré mala izoforma Q75XT0 približne 4,3 na rozdiel od pH optima A0A161ZKU8, ktoré bolo okolo pH 4,0 (**Obr. 2A**). Teplotné optimum mali rovnako vysoké, 70 °C (**Obr. 2B**), čo je hodnota typická pre tieto enzýmy [7].



Obr. 2. Charakterizácia Q75XT0. A - pH optimum, B – teplotné optimum

Záver

Proteín Q75XT0 je rovnako ako proteín A0A161ZKU8 [4] typickou glykozidhydrolázou, ktorá patrí do GH rodiny 28. Má preferenciu pre vysokomolekulárne substráty, od A0A161ZKU8 sa líši pH optimum, kým teplotné optimum majú identické. Ide o prvú čiastočnú charakterizáciu tohto enzýmu na úrovni jeho experimentálne stanovenej aktivity.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] The UniProt Consortium (2019) Nucleic Acid. Res. 47, p. D506.
- [2] Drula E., Garron M.-L., Dogan S., a kol. (2022) Nucleic Acid. Res. 50, p. D571.
- [3] Stratilová B., Horváthová A., Kozmon, S., et al. (2021) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 767.
- [4] Stratilová B., Firáková Z., Klaudíny J., a kol. (2019) Plant Mol. Biol. 100, p.181.
- [5] Stratilová B., Šesták S., Lukáčová V., a kol. (2022) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 949.
- [6] Lukáčová V., Danchenko M., Šesták S., a kol. (2022) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 860.
- [7] Stratilová E., Markovič O., Dzúrová M., a kol. (1998) Biologia, Bratislava 53, p. 731.

Elektrostatický potenciál povrchov exoglykozidhydroláz rodiny 28

Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

V prípade enzýmov, ktoré katalyzujú hydrolýzu polysacharidov zložených z kyslých jednotiek, môže zohrávať významnú úlohu v špecificite týchto enzýmov elektrostatický potenciál ich povrchu. Takýmito enzýmami môžu byť napr. izoformy exoglykozidhydroláz (exoGH) rodiny 28 [1]. Prítomnosť viacerých izoforiem sa zistila už v starších prácach, ktoré sa zaoberali charakterizáciou týchto enzýmov na úrovni stanovenia enzýmovej aktivity v surových proteínových extraktoch [2,3]. Štruktúry enzýmov sa vybrali na základe prítomnosti esenciálnych aminokyselín nevyhnutných pre katalytické vlastnosti tejto skupiny bioinformatickou analýzou proteínov [4] v databáze UniProtKB [5]. Z desiatich vybraných štruktúr boli zatiaľ dokázané predpokladané glykozidhydrolázové aktivity pre dva proteíny, A0A161ZKU8 [6] a Q75XT0.

Materiál a metódy

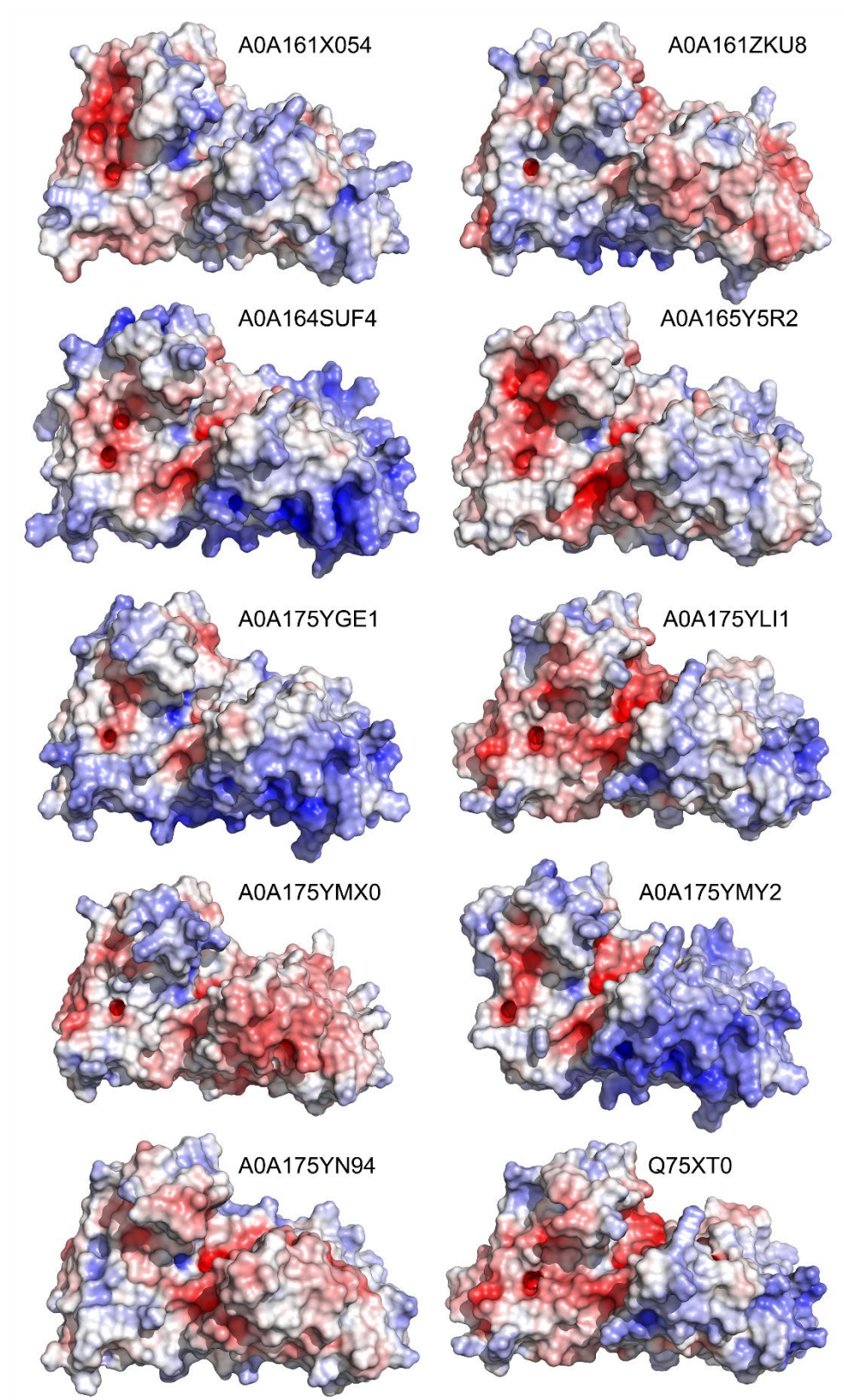
Proteínové štruktúry desiatich čiastočne charakterizovaných a potenciálnych izoforiem exoGH 28 boli vybrané na základe štúdie Stratilovej a kol [4]. Fylogenetický strom bol vytvorený v programe MEGA v7.0.26 [7] a Clustal Omega [8]. Ako modely ich terciárnych štruktúr boli použité príslušné 3D modely z databázy AlphaFold [9]. Elektrostatický potenciál ich povrchov bol zobrazený v programe PyMol [10].

Výsledky a diskusia

Fylogenetický strom vytvorený pre dve štruktúry s potvrdenou aktivitou exoglykozidhydroláz rodiny GH 28 (A0A161ZKU8 a Q75XT0) a ďalších osem štruktúr, ktoré by mohli mať tieto aktivity na základe výsledku bioinformatickej analýzy ukázal, že tieto štruktúry tvoria dve fylogenetické skupiny (**Obr. 1**).



Obr. 1. Fylogenetický strom čiastočne charakterizovaných (A0A161ZKU8, Q75XT0) a potenciálnych izoforiem exoGH 28 vytvorený programom MEGA [7].



Obr. 2. Elektrostatický potenciál povrchov čiastočne charakterizovaných (A0A161ZKU8 a Q75XT0) a potenciálnych izoforiem exoGH 28

- [1] Drula E., Garron M.-L., Dogan S., a kol. (2022) *Nucleic Acid. Res.* 50, p. D571.
- [2] Stratilová E., Markovič O., Dzúrová M. et al. (1998) *Biologia, Bratislava* 53, p. 731.
- [3] Stratilová E., Dzúrová M., Malovíková A. et al. (2005) *Z. Naturforsch.* 60c, p. 899.
- [4] Stratilová B., Horváthová A., Kozmon, S., et al. (2021) *Zborník ŠVK, Prif UK*, p. 767.
- [5] The UniProt Consortium (2019) *Nucleic Acid. Res.* 47, D506.
- [6] Stratilová B., Šesták S., Lukáčová V., a kol. (2022) *Zborník ŠVK, Prif UK*, p. 949.
- [7] Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) *Mol. Biol. Evol.* 33, p. 1870.
- [8] Sievers F., Wilm A., Dineen D.G. a kol. (2011) *Mol. Sys. Biol.* 7, **čl. 539**.
- [9] Varadi M., Anyango S., Deshpande M. a kol. (2022) *Nucleic Acid. Res.* 50, D439.
- [10] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.

Teoretická stabilita komplexu enzým-substrát a experimentálne stanovenie enzýmovej aktivity

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Úvod

Glykozidtransglykozylázy podrodiny GH 16₂₀ [1] katalyzujú štiepenie vysokomolekulárneho sacharidového substrátu, pričom následne prenášajú fragment s pôvodným neredukujúcim koncom (donorový substrát) na iný poly- alebo oligosacharid (akceptorový substrát). Enzýmy sa odlišujú rôznou donorovou a akceptorovou špecificitou, napr. pre enzým TmXET6.3 bola experimentálne stanovená široká akceptorová špecificita pre neutrálne oligosacharidy [2], kým pre štrukturálne najlepšie charakterizovaný enzým z tejto skupiny, PttXET16A [3], bola stanovená striktná špecificita aj pre donor aj pre akceptor. Simulácie stability komplexov enzým-donor-akceptor [4] ukázali, že kým komplexy TmXET6.3 boli stabilné so všetkými akceptormi, stabilita PttXET16A vyžadovala špecifickú 1,3- alebo 1,4-väzbu medzi výlučne glukózovými jednotkami. V tejto práci sme testovali, či takto získané teoretické výsledky zodpovedajú experimentálnym aj v prípade vzácnnej skupiny enzýmov, ktorá operuje aj na akceptoroch s nábojom [5].

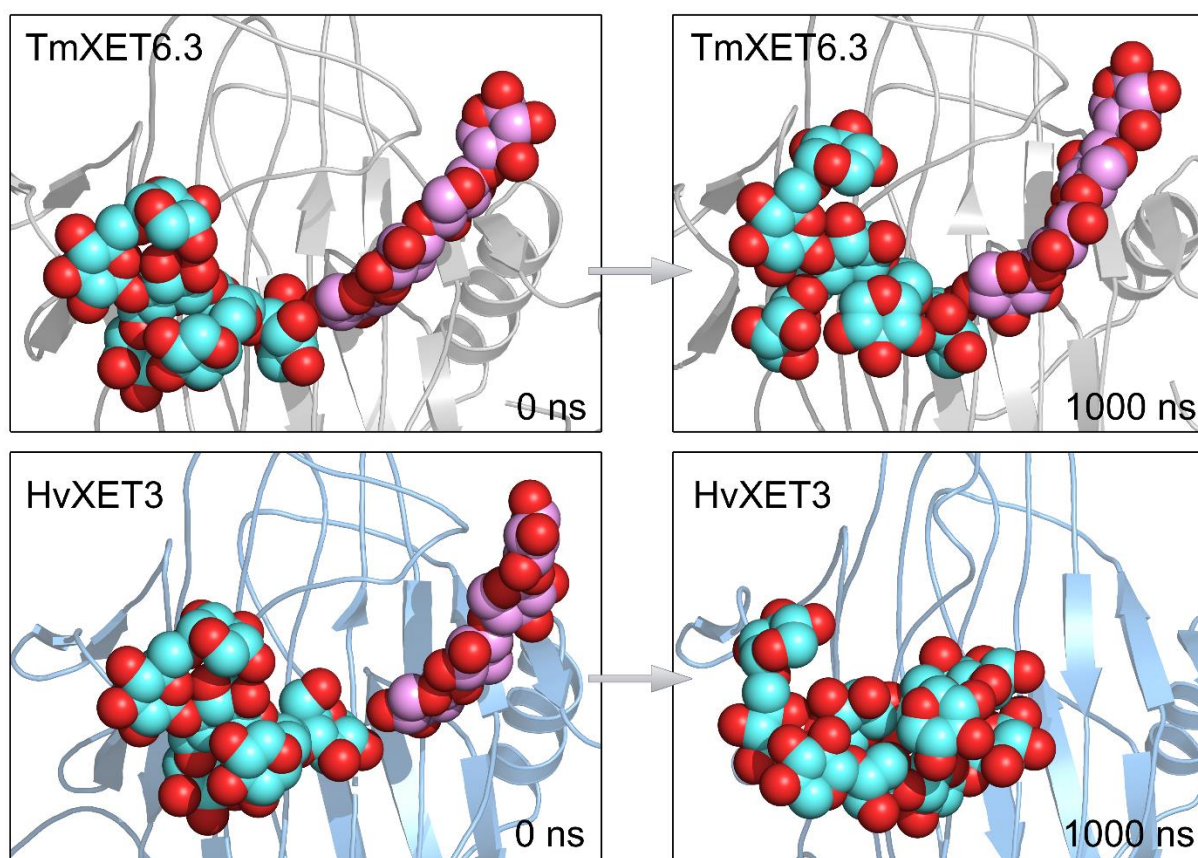
Materiál a metódy

Homológne modely TmXET6.3, jej dvojitého mutanta TmXET6.3_W75H/Y110R a HvXET3 boli zostrojené na základe koordinátov získaných z kryštalografickej štruktúry PttXET16A (templát) [3]. Homológne modely boli generované v Modeller9v6 [6]. Ako donor slúžil xyloglukán heptaoligosacharid (XG-OS7), ktorý bol dokovaný podľa koordinát pre xyloglukán nonasacharid po odstránení dvoch terminálnych galaktózových rezíduí [7]. Ako akceptor slúžili neutrálne oligosacharidy [4], v tejto práci konkrétne xylotetrasacharid (Xyl-OS4). Jeho štruktúra bola pripravená pomocou GLYCAM-web serveru [8] a upravená pre dokovanie v LigPrep tool [9]. Proteínové štruktúry boli pripravené pre dokovanie v Protein Preparation Wizard [10]. Samotné dokovanie bolo robené v programe Glide [11] a redokované pomocou Induced Fit Docking Protocol [12]. Pre simulácie molekulovou dynamikou sa štruktúry komplexov enzým-donor-akceptor pripravili v *tleap*, ktorý je súčasťou programového balíka Amber16 [13], aplikovali sa parametre silového poľa Amber ff99SB na proteíny a parametre GLYCAM06 pre sacharidy, solvatovalo sa molekulami vody TIP3P [14]. Potom boli štruktúry ekvilibrované a použité pre simulácie molekulovou dynamikou [4].

Výsledky a diskusia

Glykozidtransglykozylázy TmXET6.3, TmXET6.3_W75H/Y110R a HvXET3 sa vyznačujú nezvyklo širokou akceptorovou špecificitou, t.j. sú schopné prenášať fragmenty donora na celé spektrum štrukturálne odlišných neutrálnych poly- alebo oligosacharidov [2,5]. HvXET3 sa od TmXET6.3 líši schopnosťou využívať ako akceptor aj nabité oligosacharidy [5]. Dvojbodová mutácia TmXET6.3, TmXET6.3_W75H/Y110R viedla k získaniu schopnosti katalyzovať prenos na nabité substráty rovnako, ako tomu bolo v prípade skupiny enzýmov štrukturálne podobných s HvXET3 [5].

Pokus o simuláciu pomocou molekulovej dynamiky komplexu enzým-XG-OS7-Xyl-OS4, ktorý sa osvedčil v prípade TmXET3 a PttXET16A [4], viedol napriek experimentálne stanovenej aktivite na tento akceptor k postupnému uvoľňovaniu akceptora z väzobného miesta, pričom v čase ukončenia simulácie sa akceptor nachádzal mimo aktívneho miesta enzýmu (**Obr. 1**). Rovnaký výsledok ukázala simulácia s dvojítm mutantom TmXET6.3_W75H/Y110R, ktorý je tiež na tento akceptor aktívny.



Obr.1: Simulácia molekulovej dynamiky stability komplexov enzým (TmXET6.3, sivá alebo HvXET3, modrá) – donor (XG-OS7, tyrkysová) – akceptor (Xyl-OS4, ružová) na počiatku simulácie (0 ns) a na jej konci (1000 ns).

Záver

Z výsledkov vyplýva, že v prípade enzýmov podrodiny GH 16_20, ktoré sú schopné využívať okrem širokého spektra neutrálnych oligosacharidov ako akceptory aj nabité poly- a oligosacharidy, nie je medzi experimentálne stanovenými aktivitami a výsledkami štúdií stability komplexov enzým-donor-akceptor zhoda, ako tomu bolo v prípade špecifických enzýmov alebo enzýmov operujúcich na neutrálnych poly- a oligosacharidoch. Predpokladáme, že chyba môže byť v pozmenenej 3D štruktúre aktívneho miesta enzýmov s mutáciami, ktoré im umožňujú viazať v aktívnom mieste aj substráty s nábojom, v porovnaní s použitým templátom a/alebo s tým súvisiacim dokovaním. V dôsledku tohto môžu byť potom východzie modely enzým-donor-akceptor pre túto skupinu enzýmov chybné. Preto považujeme za nutné uskutočniť kryštalografické štúdie aj enzýmov podrodiny GH 16_20, ktoré vykazujú schopnosť transferu na nabité substráty.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Viborg A.H., Terrapon N., Lombard V. a kol. (2019) J. Biol. Chem. 294, p. 15973.
- [2] Stratilová B., Firáková Z., Klaudiny J. a kol. (2019) Plant Mol. Biol. 100, p. 181.
- [3] Johansson, P.; Brumer, H.; Baumann, M.J. a kol. (2004) Plant Cell 16, p. 874.
- [4] Stratilová B., Stratilová E., Hrmova M., Kozmon S. (2022) Int. J. Mol. Sci. 23, 11838.
- [5] Stratilová B., Šesták S., Mravec J. a kol. (2020) Plant J. 104, p. 752.
- [6] Šali A., Blundell T. (1993) J. Mol. Biol. 234, p. 779.
- [7] Mark P., Baumann M.J., Eklöf J.M. a kol. (2009) Proteins 75, p. 820.
- [8] <http://legacy.glycam.org> (accessed on 17 July 2022)
- [9] Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [10] Schrödinger Release 2015-2: Protein Preparation Wizard, Epik; Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [11] Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P. a kol. (2006) J. Med. Chem. 49, p. 6177.
- [12] Sherman W., Day T., Jacobson M.P. a kol. (2006) J. Med. Chem. 49, p. 534.
- [13] Case D.A., Betz R.M., Cerutti D.S. et al. Amber 16, University of California: San Francisco, CA, USA, 2016.
- [14] Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. a kol. (1983) J. Chem. Phys. 79, p. 926.

Umiestnenie a počet lyzínových zvyškov v C-terminálovej sekvencii vybraných glykozidtransglykozyáz a ich schopnosť viazať nabité akceptory

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

Transglykozylázy reprezentujú zvláštnu skupinu hydrolytických enzýmov, ktoré po rozštiepení polysacharidu neprenášajú jeho fragment s pôvodným neredukujúcim koncom na vodu ale na iný poly- alebo oligosacharid [1]. V minulosti boli na základe aktivity považované za skupinu transferáz [2], aktuálne sa preferuje klasifikácia na základe štrukturálnych rysov, podľa ktorej patria medzi hydrolázy [3]. Glykozidtransglykozylázy podskupiny 16_20 [4] sa líšia donorovou a/alebo akceptorovou špecifitou, pričom väčšinou sa tieto aktivity týkajú výlučne neutrálnych sacharidov [5]. Niektoré enzýmy však dokážu katalyzovať prenos neutrálnych fragmentov donorov na nabité akceptory. Boli identifikované aminokyselinové zvyšky nachádzajúce sa v základnej časti väzobného miesta [6], pričom bol použitý enzým TmXET6.3, ktorý má v C-terminálovej oblasti rovnako ako HvXET bázičné aminokyseliny, takže o tejto oblasti neposkytol žiadne nové údaje. V tejto práci sa pokúsime o koreláciu štrukturálnych údajov týkajúcich sa predmetných C-terminálových sekvencií a aktivít na dané akceptory.

Materiál a metódy

Zarovnanie primárnych štruktúr z UniprotKB [7] sa robilo programom ClustalOmega [8], 3D štruktúry enzýmov boli modelované na základe kryštalografickej štruktúry 1un1.pdb [9] programom Modeller 9v6 [10] a zobrazené v programe PyMol [11]. Aktivity na substrátový pár neutrálny donorový polysacharid/negatívne nabitý oligosacharid boli stanovené delením fluorescenčne značených produktov reakcie a pôvodného značeného akceptora na molekulovom site zapojenom do HPLC s fluorescenčným detektorom [5]. Priebeh reakcie bol sledovaný na základe narastajúcej plochy píku produktu v závislosti od dĺžky enzýmovej reakcie.

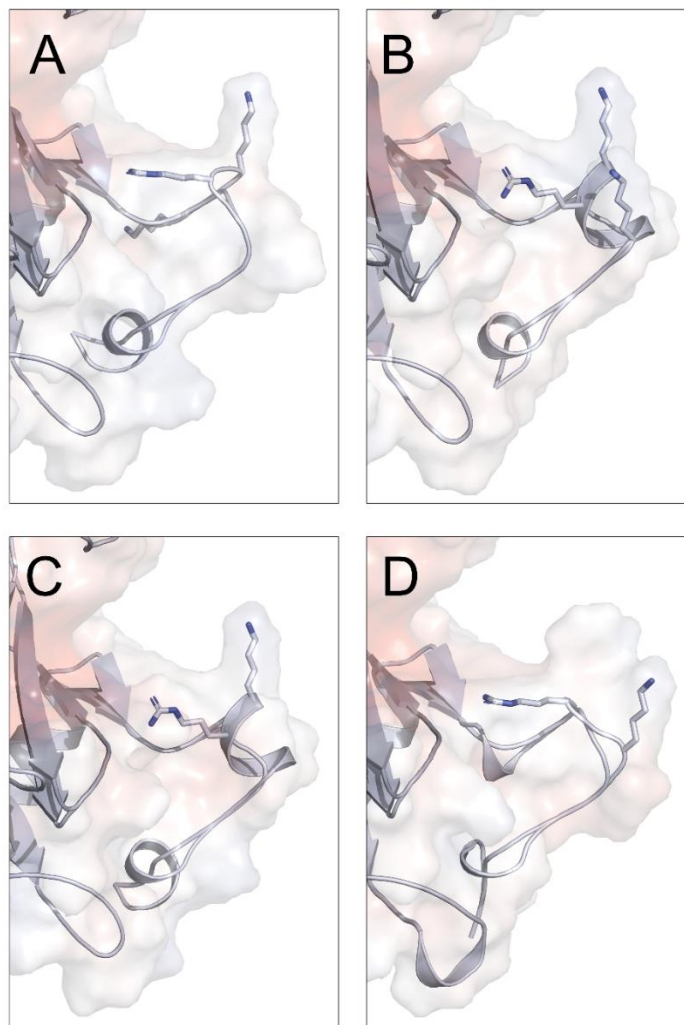
Výsledky a diskusia

Zarovnanie C-terminálových sekvencií vybraných glykozidtransglykozyáz podskupiny 16_20 je zobrazené na **Obr.1**. Tieto enzýmy, s výnimkou TmXET6.3, boli vybrané na základe ich schopnosti katalyzovať reakcie medzi neutrálnymi donormi a nabitými akceptormi [6]. TmXET6.3 takúto schopnosť získala po mutáciách W75H a Y110R (TmXET6.3_W75H/Y110R) [6]. Iné enzýmy, ktoré patria do tejto podskupiny a nemali v uvedenej sekvencii lyzínové zvyšky, takúto aktivitu nemali.

Umiestnenie a polohy konzervovaného arginínového zvyšku a okolitých lyzínových rezíduí v modeloch enzýmov zobrazuje **Obr. 2**. Všetky tieto zvyšky sú aj bez opačne nabitého substrátu naklonené smerom k miestu jeho potenciálneho viazania.

V5ZEF7_TmXET6.3	WVRDNYMIYDYC	DF	RFSQGLPRECSVN---	250
P93671_HvXET3	WVQSNYMIYNYCTDP	RVA	GVPAECSM----	272
P93672_HvXET4	WVQRKFMIYNYCTDP	RVA	QGVPAECKLR---	266
B1P1S7_HvXET6	WVQKNYMIYNYCTDTWRF	K	DGAPPECASK---	259
	**	.	**	**

Obr.1: Zarovnanie C-terminálových sekvencií vybraných glykozidtransglykozyláz podskupiny 16_20.



Obr.2: Umiestnenie a polohy arginínového a lyzínových rezíduí v C-terminálovej sekvencii vybraných glykozidtransglykozyláz podskupiny 16_20. A - TmXET6.3_W75H/Y110R, B – HvXET3, C – HvXET4, D – HvXET6.

Počet a pozície lyzínových zvyškov v tejto oblasti enzýmov a ich aktivity na daný substrátový pár sú zhrnuté v **Tab. 1**. Najaktívnejší bol mutant TmXET6.3 s dvomi lyzínovými zvyškami umiestnenými v tesnej blízkosti pred konzervovaným arginínovým zvyškom nasledovaný HvXET3, ktorá má identicky umiestnený jeden zvyšok tesne pred arginínovým a druhý pomerne blízko za ním, a potom HvXET4, ktorá má len lyzínový zvyšok pred arginínovým. HvXET6 má len jeden lyzínový zvyšok za arginínovým a najnižšiu aktivitu.

Tab.1: Výskyt bázičných aminokyselinových zvyškov (K, lyzín a R, arginín) v C-terminálovej sekvencii glykozidtransglykozyáz podskupiny 16_20 a ich aktivita na nabité akceptory.

Enzým	K234†	K237†	R238†	K240†	K241†	Aktivita na nabité akceptory
TmXET6.3_W75H/Y110R	K234	K237	R238	-	-	+++
HvXET3 (P93671)	-	K260	R261	-	K264	++(+)
HvXET4 (P93672)	-	K253	R254	-	-	+(+)
HvXET6 (B1P1S7)	-	-	R247	K249	-	+

† číslovanie aminokyselinových zvyškov v TmXET6.3

Záver

Výskyt bázičných lyzínových rezíduí v okolí konzervovaného arginínového zvyšku, ktorý sa nachádza v C-terminálovej oblasti glykozidtransglykozyáz podskupiny 16_20 je ďalším faktorom, ktorý ovplyvňuje schopnosť týchto enzýmov prenášať fragmenty neutrálnych polysacharidov na kyslé akceptorové substráty.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Nishitani K., Tominaga R. (1992) J. Biol. Chem. 267, p. 21058.
- [2] Webb E.C. Enzyme Nomenclature (1992) Academic Press Inc: San Diego, CA, USA, ISBN 0-12-227164-5.
- [3] Drula E., Garron M.-L., Dogan S., a kol. (2022) Nucleic Acid. Res. 50, p. D571.

- [4] Viborg A.H., Terrapon N., Lombard V. a kol. (2019) *J. Biol. Chem.* 294, p. 15973.
- [5] Stratilová B., Firáková Z., Klaudiny J. a kol. (2019) *Plant Mol. Biol.* 100, p. 181.
- [6] Stratilová B., Šesták S., Mravec J. a kol. (2020) *Plant J.* 104, p. 752.
- [7] The UniProt Consortium (2019) *Nucleic Acid. Res.* 47, D506.
- [8] Sievers F., Wilm A., Dineen D.G. a kol. (2011) *Mol. Sys. Biol.* 7, **čl. 539**.
- [9] Johansson P., Brumer H., Baumann M.J. a kol. (2004) *Plant Cell* 16, p. 874.
- [10] Šali A., Webb B., Madhusudhan M.S. a kol. (2009) *Modeller*, release 9v6, r6593.
- [11] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.

Elektrostatický potenciál C-terminálovej sekvencie glykozidtransglykozyláz podrodiny 16_20

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

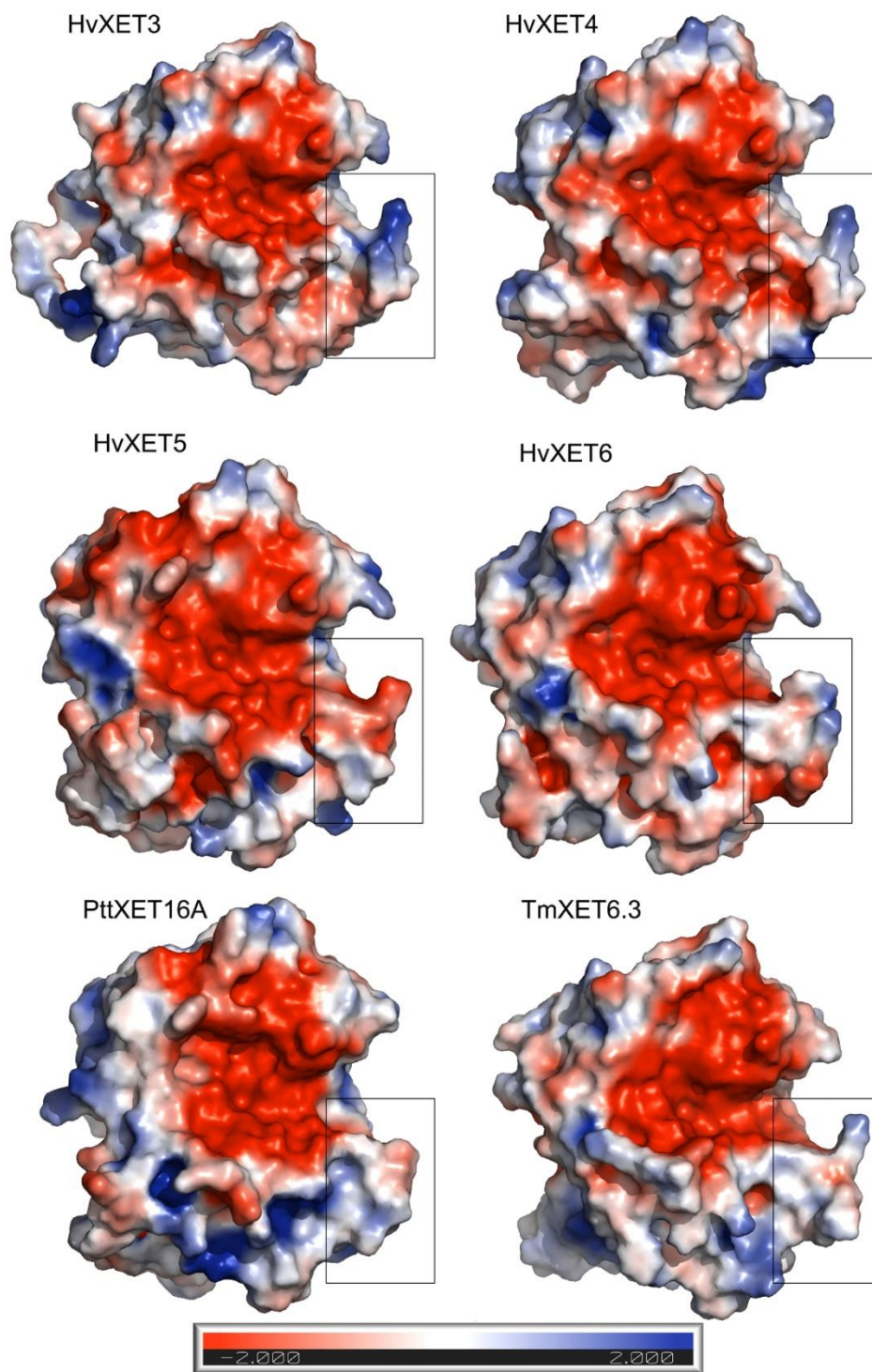
Glykozidtransglykozylázy podrodiny GH 16_20 [1] katalyzujú štiepenie polysacharidov (donor), ale na rozdiel od glykozidhydroláz neprenášajú fragment s pôvodným neredukujúcim koncom na vodu, ale na iný poly- alebo oligosacharid (akceptor). Enzýmy sa odlišujú donorovou a akceptorovou špecifitou. Kým pre štrukturálne najlepšie charakterizovaný enzým z tejto skupiny, PttXET16A [2], bola stanovená striktná špecifita aj pre donor aj pre akceptor, pre enzým z tej istej fylogenetickej skupiny, HvXET5, boli popísané aj aktivity na štrukturálne podobné donory a akceptory [3]. Enzýmy druhej fylogenetickej skupiny [4] sa vyznačujú značnou promiskuitou ohľadom najmä akceptorových substrátov, ale opäť sa dajú medzi nimi pozorovať rozdiely, keďže napr. TmXET6.3 mala síce experimentálne stanovenú širokú akceptorovú špecifitu na neutrálne oligosacharidy [5], ale nebola schopná katalyzovať prenosy fragmentov na nabitú oligosacharidy ako napr. HvXET3, HvXET4 alebo HvXET6 [6]. Tento rozdiel sa síce vysvetlil pomocou mutačnej analýzy aminokyselín väzobného miesta [6], ale stále zostala nezodpovedaná otázka týkajúca sa možnej účasti bázičných aminokyselinových zvyškov predĺženej C-terminálovej sekvencie, ktorá je typickou črtou podrodiny 20, na viazaní kyslých akceptorov. V tejto práci sme študovali elektrostatický potenciál povrchu popísaných enzýmov zameraný práve na túto C-terminálovú sekvenciu.

Materiál a metódy

Ako vzorové glykozidtransglykozylázy podrodiny 16_20 boli z databázy UniProtKB [7] vybrané formy xyloglukánendotransglykozylázy (XET), ktoré sa vyznačujú rôznou substrátovou špecifitou [2,3,5,6]. V tejto práci sú enzýmy označené skratkami HvXET3-6, TmXET6.3 a PttXET16A. Ako templát pre homológne modelovanie bola použitá jediná známa kryštalografická štruktúra XET, 1UN1.pdb [2], ktorá patrí PttXET16A. Na vytvorenie homológnych modelov sa použil program Modeller9v6 [8]. Elektrostatický potenciál povrchov enzýmov bol zobrazený v programe PyMol [9].

Výsledky a diskusia

Elektrostatický potenciál vybraných glykozidtransglykozyláz podrodiny GH 16_20 je zobrazený na **Obr.1**. Kým časť C-terminálovej sekvencie (v rámečku), ktorá predlžuje väzobné miesto pre akceptor je v prípade HvXET5 a PttXET16A kyslá (červená), t.j. nesie záporný náboj, je v HvXET3, HvXET4, HvXET6 a TmXET6.3 bázičná (modrá), t.j. obsahuje aminokyselinové zvyšky, ktoré sú schopné interagovať s kyslými sacharidmi.



Obr.1: Elektrostatický potenciál povrchov glykozidtransglykozyláz podskupiny 16_20. C-terminálová sekvencia štruktúr je orámovaná.

V súlade s týmito enzýmy HvXET5 a PttXET16A nevykazujú na kyslé akceptory žiadnu aktivitu na rozdiel od HvXET3 a HvXET4 [6]. HvXET6 má v tejto oblasti nižší pozitívny náboj ako HvXET3 a HvXET4 a jeho aktivita je na daný akceptor značne nižšia [6]. V prípade TmXET6.3, ktorej usporiadanie a elektrostatický potenciál C-terminálu je podobný ako v prípade HvXET3 a HvXET4, bola príčina absencie aktivity na kyslé oligosacharidy v aminokyselinových zvyškoch v pozíciách 75 a 110. Mutácia týchto zvyškov W75H a Y110R viedla k enzýmu TmXET6.3_W75H/Y110R schopnému využívať negatívne nabité oligosacharidy ako akceptory.

Záver

Zobrazenie elektrostatických potenciálov povrchov glykozidtransglykozyáz podrodiny GH 16_20 ukázalo, že existuje korelácia medzi hodnotami potenciálov C-terminálovej časti enzýmov a ich schopnosťou katalyzovať prenášanie donorových fragmentov na kyslé oligosacharidy v prípade, že je splnená aj podmienka prítomnosti esenciálnych bázičných aminokyselinových zvyškov v pozíciách v okolí katalytického miesta enzýmov.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Viborg A.H., Terrapon N., Lombard V. a kol. (2019) *J. Biol. Chem.* 294, p. 15973.
- [2] Johansson P., Brumer H., Baumann M.J. a kol. (2004) *Plant Cell* 16, p. 874.
- [3] Hrmova M., Farkaš V., Lahnstein J., Fincher G.B. (2007) *J. Biol. Chem.* 283, p. 27344.
- [4] Shinohara N., Nishitani K. (2021) *Plant Cell Physiol.* 62, p. 874.
- [5] Stratilová B., Firáková Z., Klaudiny J. a kol. (2019) *Plant Mol. Biol.* 100, p. 181.
- [6] Stratilová B., Šesták S., Mravec J. a kol. (2020) *Plant J.* 104, p. 752.
- [7] The UniProt Consortium (2019) *Nucleic Acid. Res.* 47, D506.
- [8] Šali A., Webb B., Madhusudhan M.S. a kol. (2009) *Modeller*, release 9v6, r6593.
- [9] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.

Vplyv polohy 1,3-glykozidickej väzby na stabilitu komplexu enzým (PttXET16A) – donor – akceptor β -(1,3;1,4)-D-glukotetrasacharid)

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

PttXET16A je jediná glykozidtransglykozyláza podrodiny 16_20, ktorá má stanovenú kryštalografickú štruktúru [1]. Napriek tomu, že experimentálne neboli stanovené žiadne heterotransglykozylačné reakcie tohto enzýmu, t.j. považuje sa za striktné špecifický, teoretické štúdie stability jeho komplexov s donorovým substrátom a viacerými štruktúrne rôznymi akceptormi naznačili, že by mohol mať potenciál prenášať fragmenty donora na akceptory, ktorých základný reťazec je tvorený glukózovými jednotkami, ktoré sú viazané glykozidickými β -(1,3)-alebo β -(1,4)-väzbami [2]. Teoretické výsledky podporuje aj fakt, že enzým HvXET5, ktorý patrí do identickej fylogenetickej skupiny ako PttXET16A, transfer na takéto donory katalyzuje [3]. V tejto práci sa venujeme štúdiu stability komplexov tohto enzýmu so substrátmi, v prípade ktorých sa akceptory, glukotetrasacharidy, líšia polohou glykozidickej 1,3-väzby medzi 1,4-väzbami (Mlg-OS4).

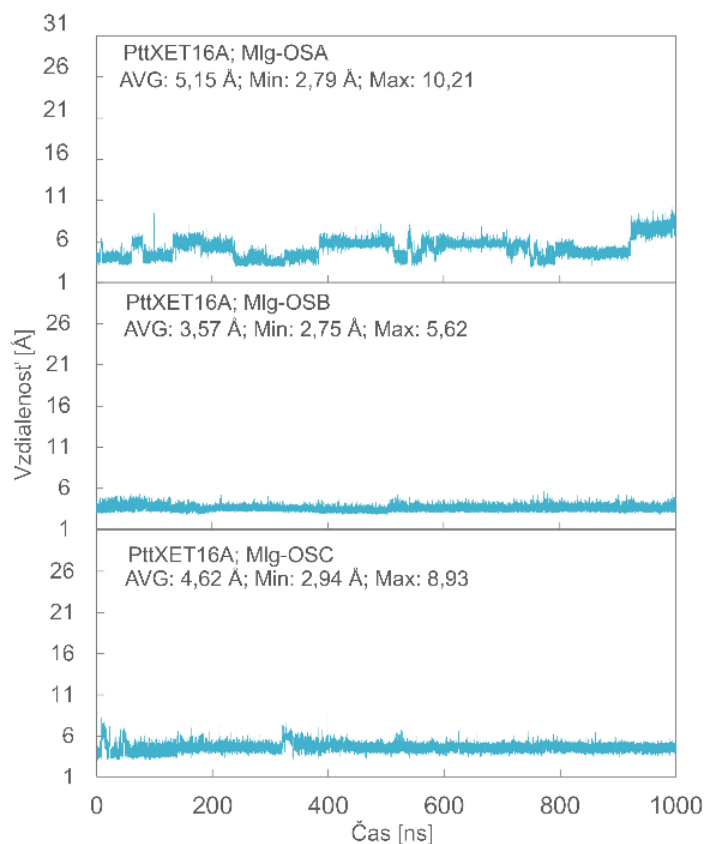
Materiál a metódy

Mlg-OS A-C (akceptory) sa líšia pozíciou glykozidickej 1,3-väzby medzi 1,4-väzbami, pričom A – 1,3-väzba sa nachádza najbližšie k neredukujúcemu koncu tetrasacharidu, B – v jeho strede, C – najbližšie k redukujúcemu koncu. Ako donor slúžil xyloglukán heptaoligosacharid, ktorý bol dokovaný podľa koordinát pre xyloglukán nonasacharid po odstránení dvoch terminálnych galaktózových rezíduí [4]. Štruktúry akceptorov boli pripravené pomocou GLYCAM-web serveru [5] a upravené pre dokovanie v LigPrep tool [6]. Proteínová štruktúra bola pripravená pre dokovanie v Protein Preparation Wizard [7]. Samotné dokovanie bolo robené v programe Glide [8] a redokované pomocou Induced Fit Docking Protocol [9]. Pre simulácie molekulovou dynamikou sa štruktúry komplexov enzým-donor-akceptor pripravili v *tleap*, ktorý je súčasťou programového balíka Amber16 [10], aplikovali sa parametre silového poľa Amber ff99SB na proteíny a parametre GLYCAM06 pre sacharidy, solvalo sa molekulami vody TIP3P [11]. Potom boli štruktúry ekvilibrované a použité pre simulácie molekulovou dynamikou [2].

Výsledky a diskusia

Časové závislosti vzdialenosti C1 donorového substrátu a O4 akceptorov umiestnených v aktívnom mieste PttXET16A študované pomocou simulácií molekulovou dynamikou, ukázali,

že vzniknuté komplexy enzým-donor substrát sú pomerne stabilné (**Obr. 1**). Keďže medzi C1 donora a O4 akceptorov sa v priebehu katalýzy vytvára glykozidická väzba, mali by zistené vzdialenosti umožňovať enzýmu katalyzovať transfer fragmentu donora na dané akceptory.

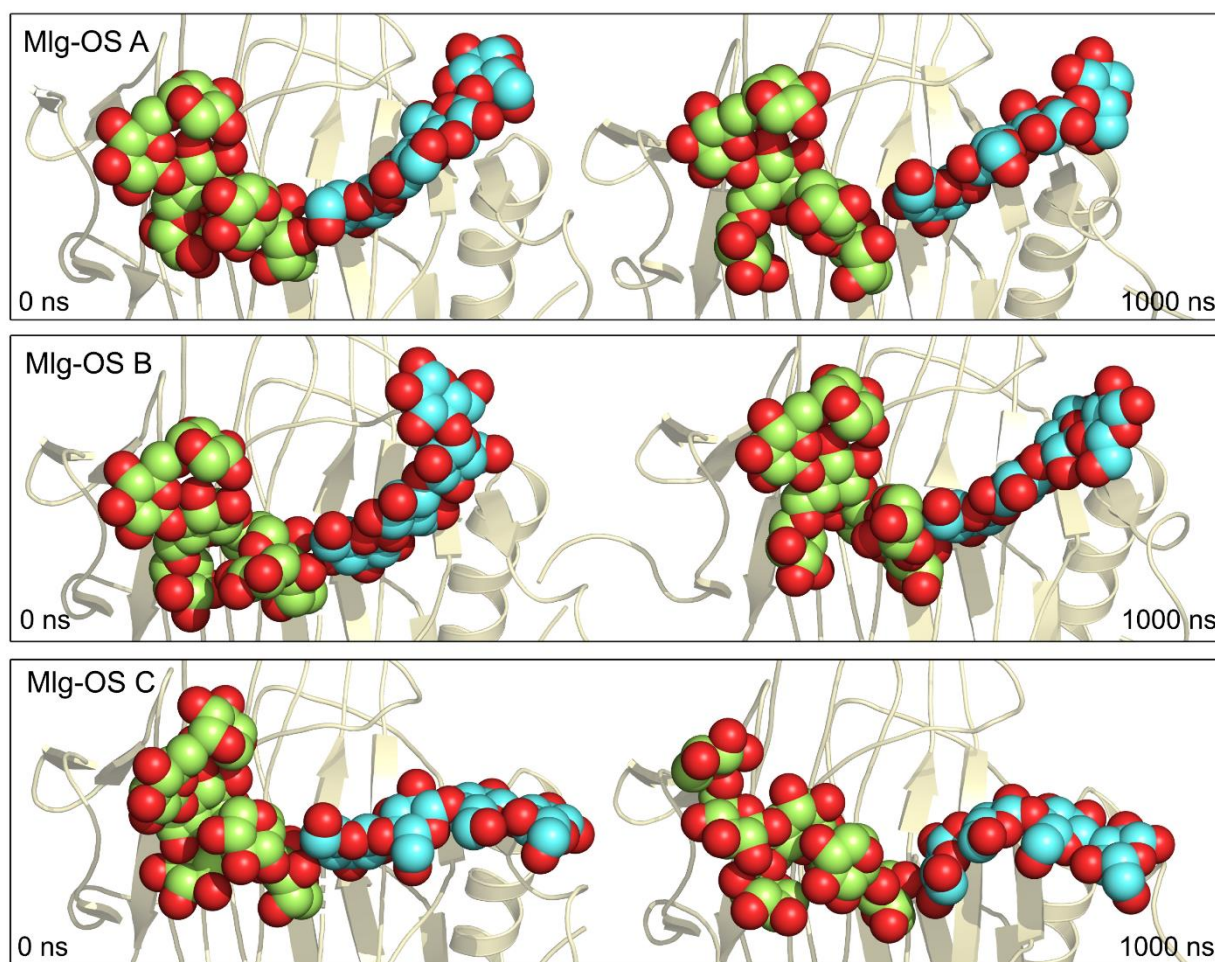


Obr.1: Časová závislosť vzdialenosti C1 donora a O4 akceptorov (Mlg-OS) v aktívnom mieste PttXET16A v priebehu simulácií molekulovou dynamikou.

Vizualizácia pozícií donora a nadokovaných akceptorov v aktívnom mieste enzýmu na začiatku simulácie MD a po 1000 ns (**Obr. 2**) tento predpoklad podporuje, pričom rovnako ako v prípade nešpecifickej TmXET6.3 [2] sa ako najnevýhodnejší akceptor prejavovali Mlg-OSA, ktoré mali glykozidickú β -(1,3)-väzbu umiestnenú najbližšie ku katalytickému miestu enzýmu. TmXET6.3 vykazovala na tento substrát aj najnižšiu experimentálne stanovenú aktivitu [12]. Hodnoty voľnej väzbovej energie komplexu PttXET16A s akceptormi Mlg-OS4 získané na základe MM(PB/GB)SA výpočtov a počítané z posledného časového úseku simulácií molekulovou dynamikou (800-1000 ns) ukázali, že voľná väzbová energia je najnižšia v prípade Mlg-OSC, t.j. v prípade substrátu, ktorý má glykozidickú β -(1,3)-väzbu najviac vzdialenú od katalytického miesta enzýmu (**Tab. 1**). Tento substrát bol tiež favorizovaný TmXET6.3 [2,12].

Tab.1: Hodnoty voľnej väzbovej energie komplexu PttXET16A s akceptormi Mlg-OS4 získané na základe MM(PB/GB)SA výpočtu. Hodnoty sú počítané z časového úseku 800-1000 ns.

Akceptor	PB		GB	
	E_{int} [kcal/mol]	$\pm \sigma$	E_{int} [kcal/mol]	$\pm \sigma$
Mlg-OSA	-30,66	9,1	-30,1	9,7
Mlg-OSB	-29,45	5,51	-30,52	5,27
Mlg-OSC	-43,33	9,72	-51,5	9,46



Obr. 2: Vizualizácia donora a nadokovaných akceptorov Mlg-OS4 na začiatku simulácie MD a po 1000 ns.

Záver

Z výsledkov štúdia stability komplexov PttXET6.3 – donor – Mlg-OS4 vyplýva, že aj tento enzým, ktorý je označovaný ako striktne špecifický, by mal viazať takéto akceptory a teda katalyzovať transfer nielen na poly- a oligoglukózové reťazce, v ktorých sú glukózové rezíduá viazané glykozidickými β -(1,3)- alebo β -(1,4)-väzbami [2], ale aj na akceptory, v ktorých sú tieto väzby zmiešané. V takomto prípade by mala byť aktivita enzýmu ovplyvnená polohou β -(1,3)-väzby a to tak, že čím by bola umiestnená ďalej od miesta, v ktorom prebieha reakcia, tým by bola aktivita enzýmu vyššia rovnako, ako to bolo v prípade nešpecifickej TmXET6.3 [12].

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Johansson, P.; Brumer, H.; Baumann, M.J. a kol. (2004) Plant Cell 16, p. 874.
- [2] Stratilová B., Stratilová E., Hrmova M., Kozmon S. (2022) Int. J. Mol. Sci. 23, čl. č. 11838.
- [3] Hrmova M., Farkaš V., Lahnstein J., Fincher G.B. (2007) J. Biol. Chem. 283, p. 27344.
- [4] Mark P., Baumann M.J., Eklöf J.M. a kol. (2009) Proteins 75, p. 820.
- [5] <http://legacy.glycam.org> (accessed on 17 July 2022)
- [6] Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [7] Schrödinger Release 2015-2: Protein Preparation Wizard, Epik; Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [8] Friesner R.A., Murphy R.B., Repaský M.P. a kol. (2006) J. Med. Chem. 49, p. 6177.
- [9] Sherman W., Day T., Jacobson M.P. a kol. (2006) J. Med. Chem. 49, p. 534.
- [10] Case D.A., Betz R.M., Cerutti D.S. et al. Amber 16, University of California: San Francisco, CA, USA, 2016.
- [11] Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. a kol. (1983) J. Chem. Phys. 79, p. 926.
- [12] Stratilová B., Firáková Z., Klaudiny J. a kol. (2019) Plant Mol. Biol. 100, p. 181.

Vplyv mutácie Q108R na stabilitu komplexu enzým (TmXET6.3) – donor - akceptor

Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

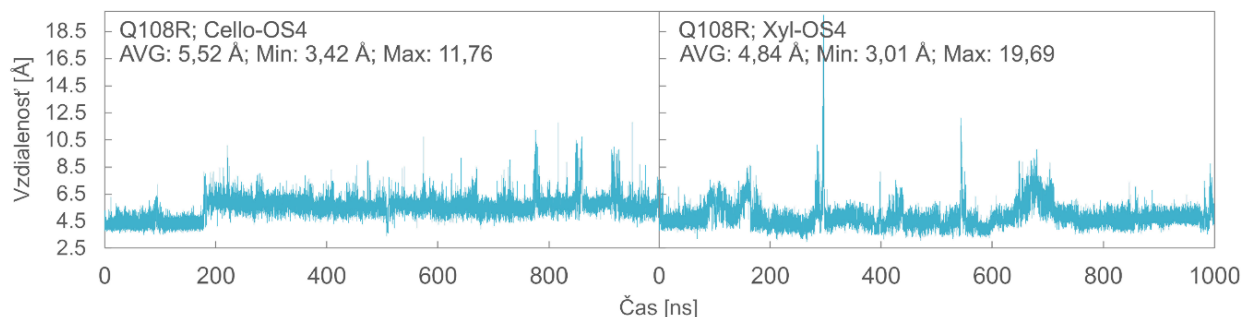
Na základe bioinformatickej analýzy špecifických a nešpecifických glykozidtransglykozyáz podrodiny 16_20 boli navrhnuté aminokyselinové zvyšky, ktoré by mohli zodpovedať za rozdielnú akceptorovú špecificitu jednotlivých enzýmov. Správnosť týchto teoretických predpokladov bola experimentálne potvrdená pomocou mutačnej analýzy [1]. Pracovalo sa s nešpecifickým enzýmom TmXET6.3, v ktorom sa ako najvýznamnejšie pre špecificitu enzýmov ukázali aminokyselinové zvyšky v polohe 94 a 108. Po mutácii Q108R, pričom R108 sa považuje za jeden z charakteristických aminokyselinových zvyškov špecifickej skupiny enzýmov I a Q108 za charakteristický zvyšok nešpecifickej skupiny II [2], bola čiastočne pozmenená substrátová špecificita enzýmu v súlade s predpokladom, t.j. aktivita na akceptor Cello-OS bola zvýšená a na Xyl-OS klesla [1]. Tieto dva akceptory boli vybrané na základe toho, že Cello-OS slúžili ako akceptory pre enzýmy aj skupiny I aj skupiny II, kým Xyl-OS boli špecifické pre skupinu II [3,4]. V tejto práci sa zaoberáme teoretickou stabilitou komplexov mutant (TmXET6.3_Q108R) – donor – akceptor (Cello-OS alebo Xyl-OS). Výsledky boli porovnané s tými, ktoré sa získali pre natívny enzým TmXET6.3 [3,4].

Materiál a metódy

Ako donor slúžil xyloglukán heptaoligosacharid, ktorý bol dokovaný podľa koordinát pre xyloglukán nonasacharid po odstránení dvoch terminálnych galaktózových rezíduí [5]. Štruktúry akceptorov boli pripravené pomocou GLYCAM-web serveru [6] a upravené pre dokovanie v LigPrep tool [7]. Proteínová štruktúra bola pripravená pre dokovanie v Protein Preparation Wizard [8]. Samotné dokovanie bolo robené v programe Glide [9] a redokované pomocou Induced Fit Docking Protocol [10]. Pre simulácie molekulovou dynamikou sa štruktúry komplexov enzým-donor-akceptor pripravili v *tleap*, ktorý je súčasťou programového balíka Amber16 [11], aplikovali sa parametre silového poľa Amber ff99SB na proteíny a parametre GLYCAM06 pre sacharidy, solvatovalo sa molekulami vody TIP3P [12]. Potom boli štruktúry ekvilibrované a použité pre simulácie molekulovou dynamikou (MD) [4].

Výsledky a diskusia

Simulácie MD Cello-OS4 a Xyl-OS4 v aktívnom mieste TmXET6.3_Q108R ukázali, že oba tieto substráty boli pomerne stabilné (**Obr. 1**). Cello-OS bol porovnateľne stabilný ako v aktívnom mieste TmXET6.3, kým v prípade Xyl-OS dochádzalo k väčším výkyvom vo vzdialenosti C1 donora a O4 akceptora [4].



Obr.1: Časová závislosť vzdialenosti C1 donora a O4 Cello-OS4 a Xyl-OS4 ako akceptorov v aktívnom mieste TmXET6.3_Q108R v priebehu simulácií MD.

Interakcie medzi aminokyselinovými rezíduami TmXET6.3_Q108R a Cello-OS4 (**Tab. 1**), boli porovnateľné s TmXET6.3 [4], pričom hlavný rozdiel spočíval v interakcii so zameneným aminokyselinovým zvyškom R108 s druhou a treťou sacharidovou jednotkou akceptora od neredukujúceho konca. Podobne v prípade akceptora Xyl-OS4, R108 interagoval s treťou xylózovou jednotkou od neredukujúceho konca, pričom v prípade TmXET6.3 k interakcii s Gln108 nedochádzalo [3,4].

Tab.1: Rezíduá TmXET6.3_Q108R, ktoré interagovali s akceptorami Cello-OS a Xyl-OS dlhšie ako 50% času simulácie MD do vzdialenosti 4 Å.

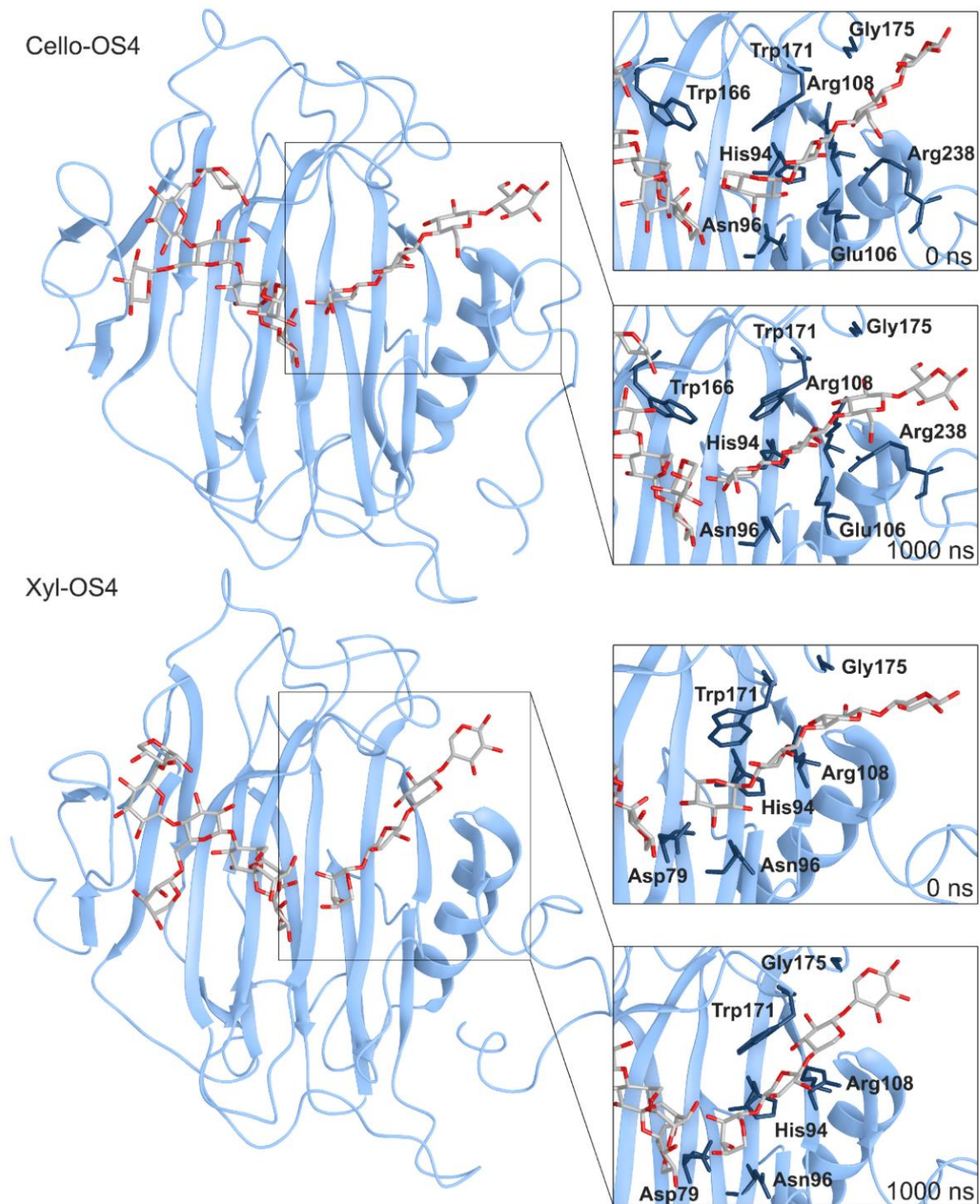
Akceptor	Interagujúce rezíduá (proteín)
Cello-OS4	His94, Asn96, Glu106, Arg108, Trp166, Trp171, Gly175, Arg238
Xyl-OS4	Asp79, His94, Asn,96, Arg108, Trp171, Gly175

Stabilná poloha, ktorú Cello-OS4 aj Xyl-OS4 zaujali počas simulácie, zodpovedala tej v TmXET6.3 [3,4] (**Obr. 2**).

Hodnota voľnej väzbovej energie (**Tab. 2**) pre Cello-OS4 v komplexe s TmXET6.3_Q108R bola nižšia ako pre Xyl-OS4, čo je v súlade s experimentálnym stanovením aktivít, podľa ktorého mutáciou Q108R aktivita na Cello-OS4 vzrástla a na Xyl-OS klesla [1].

Tab. 2 Hodnoty voľnej väzbovej energie komplexu TmXET6.3_Q108R s akceptorami Cello-OS4 a Xyl-OS4 získané na základe MM(PB/GB)SA výpočtu. Hodnoty sú počítané z časového úseku 800-1000 ns.

Akceptor	MMPBSA		MMGBSA	
	E_{int} [kcal/mol]	$\pm \sigma$	E_{int} [kcal/mol]	$\pm \sigma$
Cello-OS4	-32,49	8,56	-32,23	6,97
Xyl-OS4	-23,64	6,16	-26,25	5,71



Obr. 2: Vizualizácia donora, nadokovaných akceptorov Cello-OS4 a Xyl-OS4 a s akceptorom interagujúcich aminokyselinových rezíduí TmXET6.3_Q108R na začiatku simulácie MD a po 1000 ns.

Záver

Simulácie molekulovou dynamikou stability komplexov mutanta TmXET6.3_Q108R ukázali, že mutácia nevedla k výraznému zníženiu stability s Cello-OS alebo Xyl-OS ako akceptormi transglykozylačnej reakcie. Kým však boli Cello-OS porovnateľne stabilné vo väzobnom mieste mutanta ako v natívnej TmXET6.3, v prípade Xyl-OS dochádzalo k vyšším výkyvom vo vzdialenosti C1 donora a O4 akceptora, čo sa pravdepodobne prejavilo znížením aktivity na tento akceptor. Voľná väzbová energia komplexu bola nižšia pre Cello-OS4, čo bolo tiež v súlade s experimentálnym stanovením aktivít, podľa ktorého aktivita mutanta Q108R na Cello-OS4 bola vyššia ako na Xyl-OS4. Vo všeobecnosti sa dá konštatovať, že sa potvrdil očakávaný výsledok a mutácia Q108R prispieva k potlačeniu heterotransglykozylačných aktivít typických pre enzýmy skupiny II, aj keď nie až do takej miery, ako sa očakávalo na základe výsledkov experimentov [1].

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Stratilová B., Firáková Z., Klaudiny J. a kol. (2019) *Plant Mol. Biol.* 100, p. 181.
- [2] Shinohara N., Nishitani K. (2021) *Plant Cell Physiol.* 62, p. 874.
- [3] Hrmova M., Stratilová B., Stratilová E. (2022) *Int. J. Mol. Sci.* 23, čl. č. 1256.
- [4] Stratilová B., Stratilová E., Hrmova M., Kozmon S. (2022) *Int. J. Mol. Sci.* 23, čl. č. 11838.
- [5] Mark P., Baumann M.J., Eklöf J.M. a kol. (2009) *Proteins* 75, p. 820.
- [6] <http://legacy.glycam.org> (accessed on 17 July 2022)
- [7] Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, *Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.*
- [8] Schrödinger Release 2015-2: Protein Preparation Wizard, *Epik; Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.*
- [9] Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P. a kol. (2006) *J. Med. Chem.* 49, p. 6177.
- [10] Sherman W., Day T., Jacobson M.P. a kol. (2006) *J. Med. Chem.* 49, p. 534.
- [11] Case D.A., Betz R.M., Cerutti D.S. et al. *Amber 16*, University of California: San Francisco, CA, USA, 2016.
- [12] Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. a kol. (1983) *J. Chem. Phys.* 79, p. 926.

Vplyv mutácie H94Q na stabilitu komplexu enzým (TmXET6.3) – donor - akceptor

Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

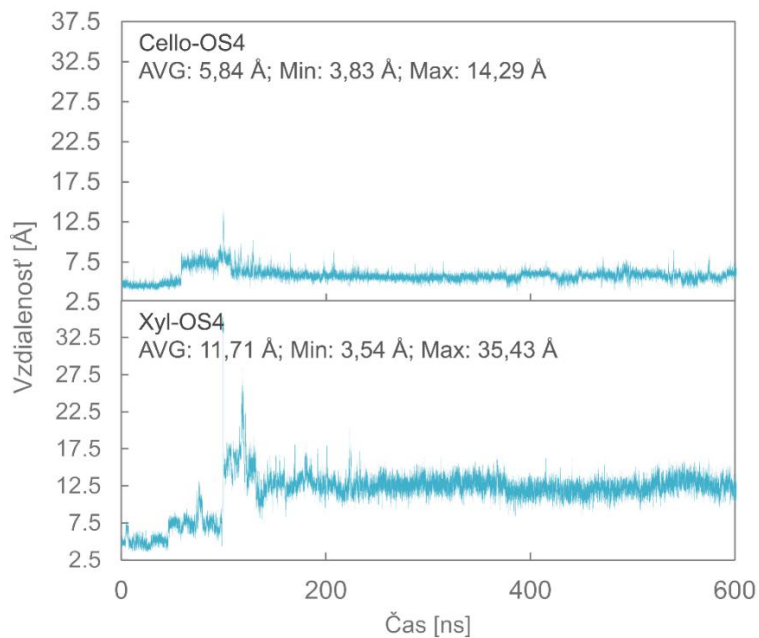
Na základe bioinformatickej analýzy špecifických a nešpecifických glykozidtransglykozyláz (GH) 16_20 boli navrhnuté aminokyselinové zvyšky, ktoré by mohli zodpovedať za rozdielnú akceptorovú špecifitu enzýmov I a II skupiny tejto podrodiny [1]. Správnosť teoretických výsledkov bola experimentálne potvrdená pomocou mutačnej analýzy [2]. Pracovalo sa s nešpecifickým enzýmom TmXET6.3, v ktorom sa ako esenciálne aminokyselinové zvyšky pre akceptorovú promiskuitu identifikovali tie, ktoré sa nachádzali v polohe 94 a 108. Po mutácii H94Q, pričom Q94 sa neskôr začal považovať za jeden z charakteristických aminokyselinových zvyškov špecifickej skupiny enzýmov I a H94 za charakteristický zvyšok nešpecifickej skupiny II [1], bola čiastočne pozmenená substrátová špecifita enzýmu v súlade s predpokladom, t.j. aktivita na akceptor Cello-OS bola zvýšená a na Xyl-OS klesla [1]. V tejto práci sa zaoberáme teoretickou stabilitou komplexov mutant – donor – akceptor, pričom ako akceptory slúžia tetracelooligosacharidy (Cello-OS) a xylooligosacharidy (Xyl-OS). Ako sa zistilo na základe experimentálnych meraní, Cello-OS slúžili ako akceptory pre enzýmy aj skupiny I aj skupiny II, kým Xyl-OS boli špecifické pre skupinu II [3,4].

Materiál a metódy

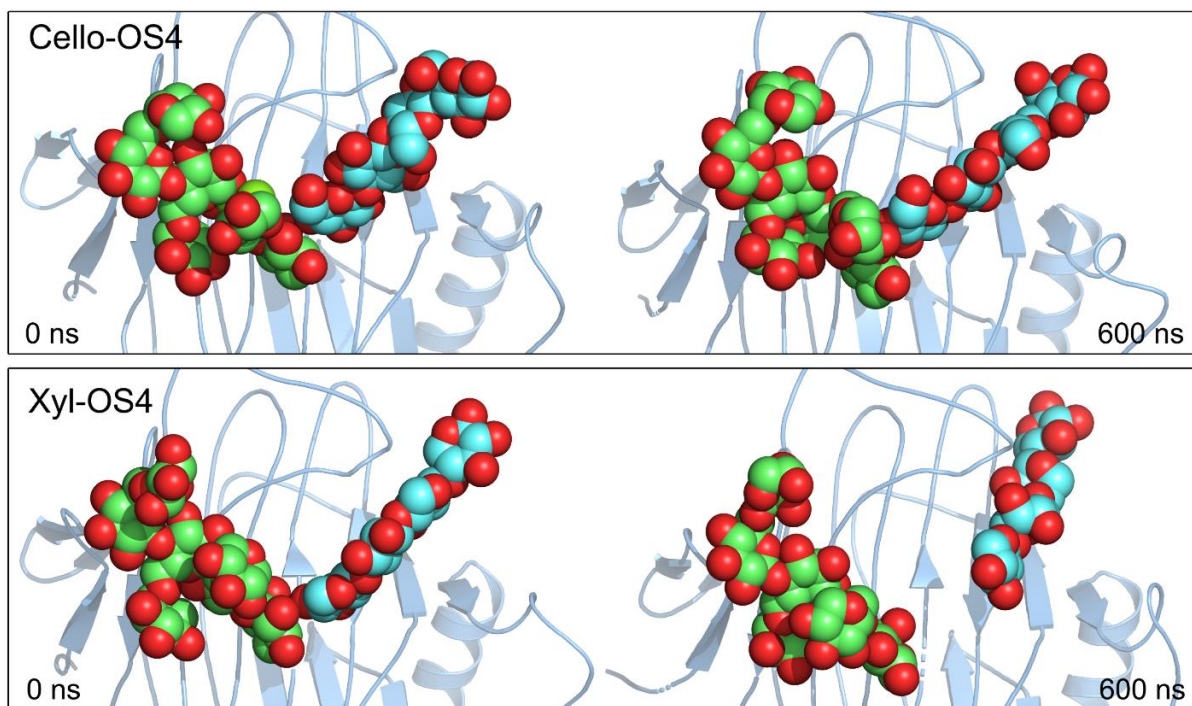
Ako donor slúžil xyloglukán heptaoligosacharid, ktorý bol dokovaný podľa koordinát pre xyloglukán nonasacharid po odstránení dvoch terminálnych galaktózových rezíduí [5]. Štruktúry akceptorov boli pripravené pomocou GLYCAM-web serveru [6] a upravené pre dokovanie v LigPrep tool [7]. Proteínová štruktúra bola pripravená pre dokovanie v Protein Preparation Wizard [8]. Samotné dokovanie bolo robené v programe Glide [9] a redokované pomocou Induced Fit Docking Protocol [10]. Pre simulácie molekulovou dynamikou (MD) sa štruktúry komplexov enzým-donor-akceptor pripravili v *tleap*, ktorý je súčasťou programového balíka Amber16 [11], aplikovali sa parametre silového poľa Amber ff99SB na proteíny a parametre GLYCAM06 pre sacharidy, solvatovalo sa molekulami vody TIP3P [12]. Potom boli štruktúry ekvilibrované a použité pre simulácie MD [4].

Výsledky a diskusia

Časová závislosť vzdialenosti C1 donora a O4 Cello-OS4 a Xyl-OS4 ako akceptorov v aktívnom mieste mutantu TmXET6.3_H94Q v priebehu 600 ns simulácií MD je zobrazená na **Obr. 1** a vizualizácia pozícií donora a akceptorov na začiatku simulácie a po 600 ns na **Obr. 2**.



Obr.1: Časová závislosť vzdialenosti C1 donora a O4 Cello-OS4 a Xyl-OS4 ako akceptorov v aktívnom mieste TmXET6.3_H94Q v priebehu simulácií MD.



Obr. 2: Vizualizácia donora a nadokovaných akceptorov Cello-OS4 a Xyl-OS4 v aktívnom mieste mutanta TmXET6.3_H94Q na začiatku simulácie MD a po 600 ns.

V prípade Cello-OS4 sa počiatočná vzdialenosť mrdzi C1 donora a O4 akceptora ustálila na hodnotách (priemerná vzdialenosť 5,84 Å), ktoré umožňujú vznik glykozidickej väzby medzi týmito atómami. V prípade Xyl-OS4 sa síce tiež po približne 130 ns simulácie vzdialenosti relatívne ustálili, ale atómy ostali od seba vzdialené (priemerná vzdialenosť 11,71 Å) (**Obr. 1**). Vizualizácia pozície donora a akceptorov v aktívnom mieste mutantu (**Obr. 2**) na začiatku a na konci simulácie jasne preukázala, že kým Cello-OS ostali naviazané v akceptorovom väzobnom mieste, Xyl-OS sa z neho uvoľnili a stabilizovali v polohe, ktorá vznik glykozidickej väzby neumožňovala.

Záver

Mutácia H94Q viedla v prípade Xyl-OS4 k destabilizácii polohy tohto akceptora v aktívnom mieste enzýmu, v dôsledku čoho došlo k takému vzdialeniu C1 donora a O4 akceptora, že transglykozylačná reakcia sa nemohla zrealizovať. Toto je v súlade so zistením, že enzýmy skupiny I, ktoré majú v polohe 94 Gln (Q), Xyl-OS ako akceptor využívať nevedia. Komplex mutant – donor – Cello-OS4 bol stabilný podľa očakávania v priebehu celej simulácie MD. Výsledky naznačujú, že v prípade, ak sú akceptormi oligosacharidy s inými ako glukózovými rezíduami v základnom reťazci, mutácia H94Q destabilizuje komplex enzým – donor – akceptor viac, ako mutácia Q108R, ktorej vplyv na heterotransglykozylačné aktivity sa posudzoval na základe experimentálne stanovených aktivít natívneho enzýmu a jeho mutantov [2].

Podakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Shinohara N., Nishitani K. (2021) Plant Cell Physiol. 62, p. 874.
- [2] Stratilová B., Firáková Z., Klaudiny J. a kol. (2019) Plant Mol. Biol. 100, p. 181.
- [3] Hrmova M., Stratilová B., Stratilová E. (2022) Int. J. Mol. Sci. 23, čl. č. 1256.
- [4] Stratilová B., Stratilová E., Hrmova M., Kozmon S. (2022) Int. J. Mol. Sci. 23, čl. č. 11838.
- [5] Mark P., Baumann M.J., Eklöf J.M. a kol. (2009) Proteins 75, p. 820.
- [6] <http://legacy.glycam.org> (accessed on 17 July 2022)
- [7] Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [8] Schrödinger Release 2015-2: Protein Preparation Wizard, Epik; Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [9] Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P. a kol. (2006) J. Med. Chem. 49, p. 6177.
- [10] Sherman W., Day T., Jacobson M.P. a kol. (2006) J. Med. Chem. 49, p. 534.
- [11] Case D.A., Betz R.M., Cerutti D.S. et al. Amber 16, University of California: San Francisco, CA, USA, 2016.
- [12] Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. a kol. (1983) J. Chem. Phys. 79, p. 926.

Dokovanie oligosacharidov do aktívneho miesta glykozidhydrolázy rodiny 28 podľa templátu 2uvf.pdb

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

Úvod

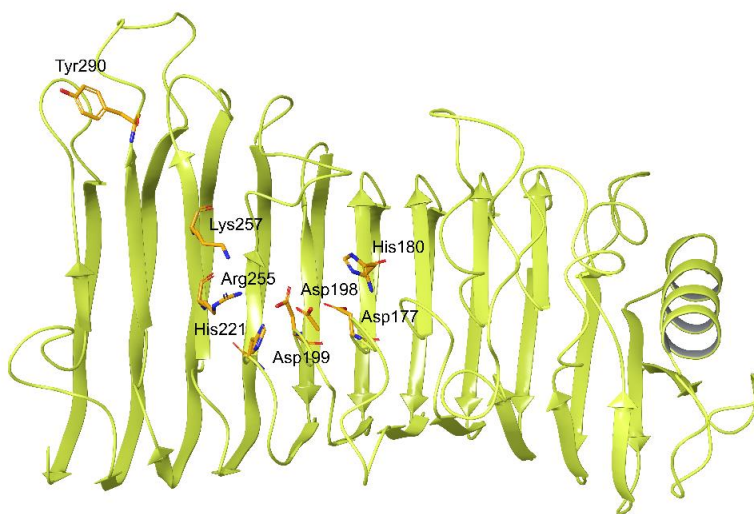
Proteín A0A175YMX0 bol vybraný na základe databázového vyhľadávania [1] a následnej bioinformatickej analýzy zameranej na esenciálne aminokyselinové zvyšky glykozidhydrolázovej (GH) rodiny 28 [2] bol identifikovaný ako potenciálny člen tejto rodiny [3]. Neskôr bol pripravený jeho syntetický gén, ktorý po inkorporácii do *Pichia pastoris* GS115 slúžil na produkciu tohto proteínu do metanolového kultivačného média, z ktorého bol izolovaný a čiastočne biochemicky charakterizovaný [4]. V tomto príspevku sa zaoberáme interakciami jeho esenciálnych aminokyselín s atómami oligosubstrátov s rôznym polymerizačným stupňom (DP), ktoré umožňujú viazanie substrátov do aktívneho miesta enzýmu a samotnú katalýzu hydrolytickej reakcie.

Materiál a metódy

Bola použitá 3D štruktúra A0A175YMX0 z databázy AlphaFold [5]. Substráty s polymerizačným stupňom 2-4 boli dokované podľa kryštalografickej štruktúry enzýmu z *Yersinia enterocolitica* 2uvf.pdb [6]. Interakčné diagramy enzýmu so substrátmi boli robené v Maestro [7].

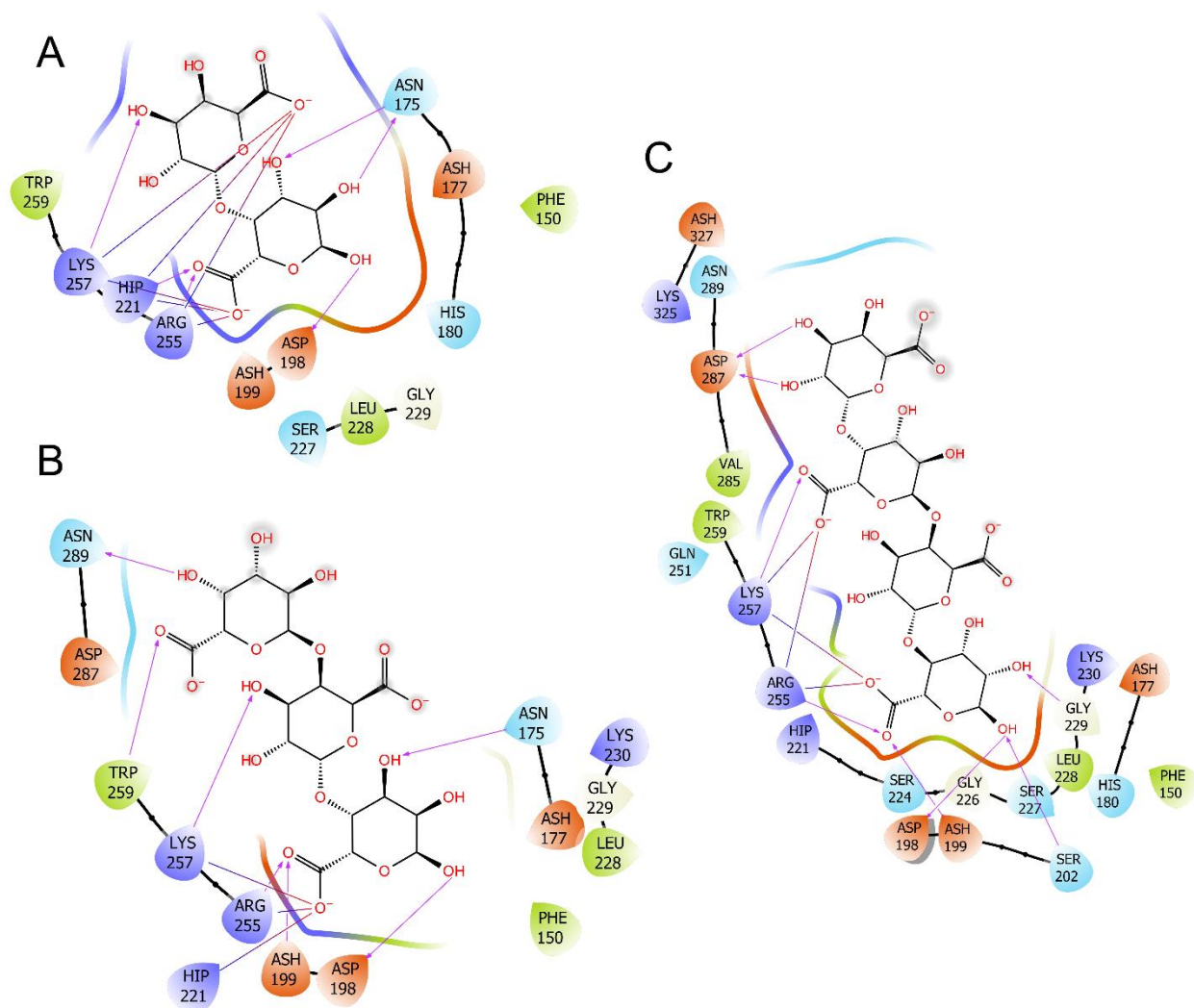
Výsledky a diskusia

3D model proteínu A0A175YMX0 z databázy AlphaFold s vyznačenými esenciálnymi aminokyselinovými zvyškami GH 28 je zobrazený na **Obr. 1**.



Obr.1: Model 3D štruktúry proteínu A0A175YMX0 (AlphaFold) s vyznačenými esenciálnymi aminokyselinami, ktoré mu umožňujú viazať kyslé oligo- alebo polysacharidy a katalyzovať ich hydrolyzu.

Obr. 2 zobrazuje interakčné diagramy A0A175YMX0 s oligogalakturónovými kyselinami s DP 2 (**A**), 3 (**B**) a 4 (**C**). Na dokovanie substrátov sa použila kryštalografická štruktúra enzýmu s dimérom, 2uvf.pdb, ktorá podľa názvu enzýmu v databáze a príslušnej literatúre [6] by mala zodpovedať A0A175YMX0. Vzhľadom na to, že sa v prípade tohto enzýmu predpokladalo na základe jeho pôvodu a spôsobu účinku štiepenie polymérneho substrátu po monoméroch z neredukujúceho konca oligosacharidu, je zrejmé, že diagramy sú zaťažené závažnou chybou., keďže k štiepeniu evidentne dochádza od redukujúceho konca oligosacharidu.



Obr.2: Interakčné diagramy A0A175YMX0 so substrátmi s rôznym polymerizačným stupňom. A – dimér, B – trimér, C – tetamér.

Záver

Vzhľadom na orientáciu substrátov v aktívnom mieste enzýmu vyplývajúcu z interakčných diagramov sa domnievame, že kryštalografická štruktúra 2uvf.pdb nepatrí enzýmu s EC 3.2.1.67, ktorý hydrolyzuje štiepenie substrátu po jednom sacharidovom zvyšku od neredukujúceho konca ako je uvedené [6], ale enzýmu s EC 3.2.1.82, ktorý odštiepuje diméry [2]. Dimér sa potom v kryštalografickej štruktúre 2uvf.pdb nachádza v pozícii produktu a nie substrátu, v dôsledku čoho sa nedá použiť ako model pre dokovanie substrátov s vyšším DP, keďže katalytické aminokyselinové zvyšky reagujú s redukujúcou jednotkou oligosacharidov namiesto s neredukujúcou, v dôsledku čoho sa katalýza nemá ako zrealizovať. Keďže v súčasnosti žiadny iný vhodnejší templát k dispozícii pre tento typ enzýmov k dispozícii nie je, je nevyhnutné stanoviť kryštalografickú štruktúru pre EC 3.2.1.67.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] The UniProt Consortium (2019) Nucleic Acid. Res. 47, D506.
- [2] Drula E., Garron M.-L., Dogan S., a kol. (2022) Nucleic Acid. Res. 50, p. D571.
- [3] Stratilová B., Horváthová A., Kozmon, S., et al. (2021) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 767.
- [4] Stratilová B., Šesták S., Lukáčová V., a kol. (2022) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 949.
- [5] Varadi M., Anyango S., Deshpande M. a kol. (2022) Nucleic Acid. Res. 50, D439.
- [6] Abbot D.W., Boraston A.B. (2007) J Mol Biol 368, p. 1215.
- [7] Maestro, Schrödinger, LLC: Schrödinger release 2018-1.

Štúdium *in silico* vybraných polyfenolických látok ako inhibítorov M^{pro} vírusu SARS-CoV-2

Jana Viskupičová¹, Petronela Rezbáriková¹, Lucia Kováčiková^{1,2}, Peter Šramel^{1,2} a Magdaléna Májeková¹

¹ Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centrum experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, Bratislava, SR

² Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, Bratislava, SR

Abstrakt

V práci prinášame výsledky nášho štúdia *in silico* polyfenolických látok a ich afinite voči enzýmu M^{pro} koronavírusu SARS-CoV-2. Vybrali sme set ôsmich polyfenolických prírodných látok: baikaleín, kurkumín, hesperetín, myricetín, naringenín, kvercetin, resveratrol a rutín a zistili sme možnosti predikcie inhibičnej aktivity pomocou dokovacieho skóre a zmeny konformačnej energie. Pre celkovú afinitu látok zohráva úlohu okrem interakcie s katalytickými amínokyselinami His41 a Cys145 aj interakcia s Glu166, ktorá je kľúčová pri tvorbe funkčných dimérov proteínu.

Úvod

Koronavírus SARS-CoV-2 (z angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) vyvoláva závažné ochorenie COVID-19 (z angl. Coronavirus disease 2019). Jedná sa o vysoko prenosné respiračné ochorenie, ktoré negatívne ovplyvnilo celosvetové verejné zdravie. Z tohto dôvodu je nutné hľadať účinné antivírusové stratégie na boj proti COVID 19. Protivírusové prístupy sú založené na blokovanií replikácie betakoronavírusu, počnúc od väzby na receptor, vstup, fúziu až po samotnú replikáciu. Hlavná proteáza tohto vírusu (M^{pro}) patrí medzi neštruktúrne proteíny SARS-CoV-2 vírusu. Bola zaradená medzi perspektívne vírusové ciele kvôli jej významu pri replikácii SARS-CoV-2 a vysokej miere zachovania sekvencie v rámci rôznych koronavírusov [1]. Doteraz bolo identifikovaných množstvo zlúčenín s inhibičným potenciálom voči M^{pro}, len pár z nich však vstúpilo do klinických štúdií. Keďže metódy počítačového modelovania umožňujú predikovať inhibičnú aktivitu látok so známou štruktúrou voči M^{pro}, vybrali sme set ôsmich prírodných látok: baikaleín [2], kurkumín [3], hesperetín [4], myricetín [5], naringenín [6], kvercetin [3], resveratrol [3] a rutín [7] a porovnali sme predikované afinity s experimentálnymi hodnotami.

Metódy

In silico štúdium bolo urobené pomocou programu MOE 2019.01 (Chemical Computing Group ULC, 2022). Použili sme štruktúru vírusovej proteázy s pdb kódom 6y2e získanej z proteínovej databanky (<https://www.rcsb.org/structure/6Y2E>). Štruktúra proteínu bola upravená pomocou protokolu Structure Preparation, ktorý umožňuje opraviť prípadné chyby v prevzatej geometrii a následného protonačného protokolu Protonate 3D Tool pri fyziologickom pH. Po zoptimalizovaní geometrie pomocou silového poľa Amber10:ETH boli v proteíne vybrané miesta na doking pomocou funkcie Site Finder.

Štruktúry polyfenolických látok boli zostrojené a predoptimalizované v programe Spartan (SPARTAN'08 (Wavefunction Inc., Irvine, CA92612, USA). Databáza látok (ligandov) bola následne upravená v programe MOE metódou Quick Preparation. Látky boli dokované pomocou protokolu Triangle Matcher a vyhodnotené pomocou funkcie London dG scoring function. Najlepších 30 umiestnení ligandu bolo vždy prehodnotených pomocou metodológie Induced Fit a bodovacej funkcie GBVI/WSA dG, ktorá poskytla 5 umiestnení s najlepším skóre. Okrem hodnoty skóre sme posudzovali aj zmenu v konformačnej energii E_{conf} , ktorá umožnila posúdiť výhodnosť resp. nevýhodnosť získanej konformácie oproti geometrii neviazaného ligandu.

Výsledky a diskusia

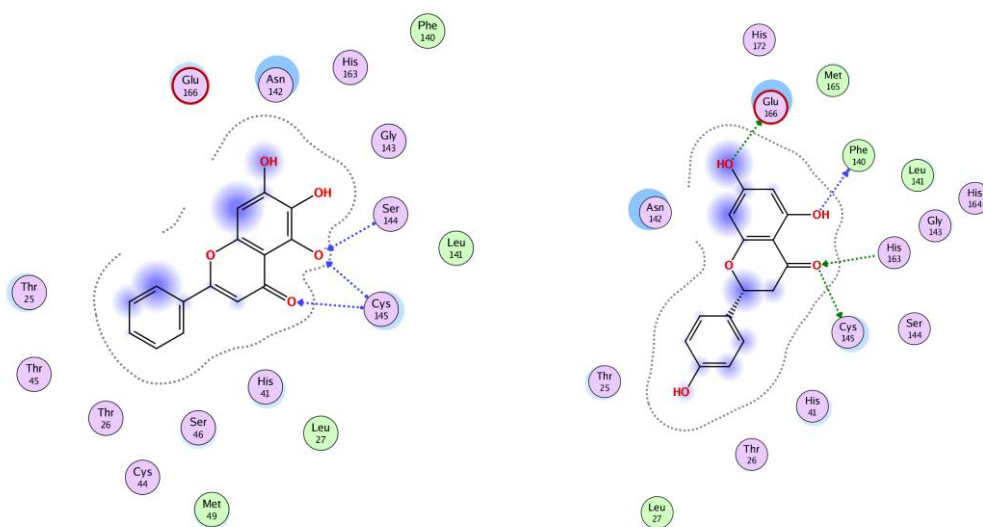
V tabuľke 1 sú uvedené hodnoty dokovacieho skóre, zmeny v konformačnej energii E_{conf} a experimentálnych hodnôt IC_{50} pre inhibíciu M^{pro} enzýmu. Zo získaných hodnôt skóre a E_{conf} je zrejmé, že zmena konformačnej energie do veľkej miery ovplyvňuje predikovanú afinitu voči enzýmu M^{pro} , čo ukazujú výhodné zmeny v konformačnej energii pre baikaleín a naringenín, kým v prípade rutínu môžeme hovoriť o výraznej konformačnej penalte.

Analýzou interakčných diagramov sme zistili, že študované ligandy najčastejšie vytvárajú vodíkové väzby so zvyškami His41, Phe140, Ser144, Cys145 a Glu166. Porovnali sme interakčné diagramy dvoch najúčinnjších látok – baikaleínu a naringenínu (Obr. 1). Obidve látky vytvárajú vodíkové väzby s katalytickým zvyškom Cys145, ale naringenín navyše tvorí vodíkovú väzbu aj s Glu166, zodpovednou za dimerizáciu M^{pro} .

Záverom možno povedať, že vypracovaný protokol na dokovanie polyfenolických látok poskytuje možnosti odhadu inhibičnej aktivity týchto látok voči M^{pro} enzýmu, pričom významnú úlohu zohráva zmena konformačnej energie ligandu pri vytvorení komplexu s proteínom.

Tabuľka 1. Hodnoty dokovacieho skóre, zmeny v konformačnej energii E_{conf} a experimentálnych hodnôt IC_{50} pre inhibíciu M^{pro} enzýmu.

ligand	CAS	Skóre	Econf (kJ/mol)	IC_{50} (μM)
baikaleín	491-67-8	-6.8	-71.0	0.4 ⁽²⁾
kurkumín	458-37-7	-6.8	-35.0	11.9 ⁽³⁾
hesperetín	520-33-2	-6.1	-27.0	8.3 ⁽⁴⁾
myricetín	529-44-2	-6.3	3.1	3.7 ⁽⁵⁾
naringenín	67604-48-2	-6.9	-42.2	0.1 ⁽⁶⁾
kvercetín	117-39-5	-6.1	5.9	23.4 ⁽³⁾
resveratrol	501-36-0	-5.3	-47.0	16.9 ⁽³⁾
rutín	153-18-4	-8.0	151.0	32.0 ⁽⁷⁾



Obr. 1. Porovnanie interakčnej mapy myricetínu (vľavo) a naringenínu (vpravo) vo väzbovom mieste M^{pro} enzýmu. Čiarkované čiary predstavujú vodíkové väzby.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na ochorenie COVID-19, ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Gao K, Wang R, Chen J, Tepe JJ, Huang F, Wei GW. Perspectives on SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2021, 64, 16922–16955
2. Liu H, Ye F, Sun Q, Liang H, Li C, Li S, Lu R, Huang B, Tan W, Lai L. Scutellaria baicalensis extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease in vitro. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2021, 36, 1, 497-503
3. Bahun M, Jukić M, Oblak D, Kranjc L, Bajc G, Butala M, Bozovičar K, Bratkovič T, Podlipnik Č, Poklar Ulrih N. Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro main protease by plant polyphenols. *Food Chem.* 2022, 373, 131594
4. Lin CW, Tsai FJ, Tsai CH, Lai CC, Wan L, Ho TY, Hsieh CC, Chao PDL. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of Isatis indigotica root and plant-derived phenolic compounds. *Antiviral Res.* 2005, 68, 36–42
5. Xiao T, Cui M, Zheng C, Wang M, Sun R, Gao D, Bao J, Ren S, Yang B, Lin J, Li X, Li D, Yang C, Zhou H. Myricetin Inhibits SARS-CoV-2 Viral Replication by Targeting Mpro and Ameliorates Pulmonary Inflammation. *Front. Pharmacol.* 2021, 12, 669642
6. Abdallah HM, El-Halawany AM, Sirwi A, El-Araby AM, Mohamed GA, Ibrahim SRM, Koshak AE, Asfour HZ, Awan ZA, Elfaky MA. Repurposing of Some Natural Product Isolates as SARS-COV-2 Main Protease Inhibitors via In Vitro Cell Free and Cell-Based Antiviral Assessments and Molecular Modeling Approaches. *Pharmaceuticals* 2021, 14, 3, 213
7. Rizzuti B, Grande F, Conforti F, Jimenez-Alesanco A, Ceballos-Laita L, Ortega-Alarcon D, Vega S, Reyburn HT, Abian O, Velazquez-Campoy A. Rutin is a low micromolar inhibitor of sars-cov-2 main protease 3clpro: Implications for drug design of quercetin analogs. *Biomedicines* 2021, 9, 4, 375

Identifikácia inozitolov v rastline *Stellaria media* hmotnostnou spektrometriou

Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý¹

¹Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Inozitoly sú najrozšírenejšie cyklitoly v eukaryotických bunkách, s empirickým vzorcom $C_6H_{12}O_6$ (1,2,3,4,5,6-cyklohexanol). Tieto chemické zlúčeniny existujú v deviatich možných stereoizoméroch. Päť z nich, myo-, scyllo-, muco-, neo- a D-chiro-inozitol sa vyskytujú v prírode, kým ostatné štyri možné izoméry (L-chiro-, allo-, epi- a cis-inozitol) sú odvodené z myo-inozitolu [1]. Medzi všetkými známymi inozitolmi sa v prírode najviac vyskytuje myo-inozitol. Je vo všetkých eukaryotických bunkách, kde tvorí štruktúrny základ pre množstvo sekundárnych látok. Je tiež dôležitou zložkou stavebných lipidov (fosfatidylinozitol) PI a ich rôznych fosfátov, fosfatidylinozitol fosfátových lipidov PIP. Niektoré inozitoly sú bežne v prírode ako čisté látky alebo ako ich deriváty [2].

Niektoré z metyléter derivátov inozitolu sú rastlinné sekundárne metabolity, zlúčeniny, ktoré sa priamo nezúčastňujú normálneho rastu, ale hrajú dôležitú úlohu v obrane proti nepriaznivým podmienkam prostredia. Medzi nimi rozlišujeme 5-O-metyl-myo-inozitol (*sequoyitol*), 1-O-metyl-myo-inozitol (*bornesitol*), 4-O-metyl-myo-inozitol (*ononitol*), 5-O-metyl-allo-inozitol (*brahol*), di-O-metyl-(+)-chiro-inozitol (*pinpollitol*) a 1L-2-O-metyl-chiro-inozitol (*L-quebrachitol*). 3-O-metyl-D-chiro-inozitol (*D-pinitol*) je najrozšírenejší inozitol éter v rastlinách [3].

Protizápalové vlastnosti cyklitolov pomáhajú redukovať rozvoj metabolických porúch (cukrovka, hypertenzia) a aterosklerózy. Známe sú aj inzulín-napodobujúce účinky D-pinitolu, D-chiro-inozitolu a sequoyitolu. Myo-inozitol spolu s D-chiro-inozitolom dokáže zlepšiť vývoj kostí a minerálnu hustotu kostí, čím potláčajú osteoklastogénu. Myo-inozitol a ostatné cyklitoly majú tiež antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti [4].

Hviezdica prostredná (*Stellaria media*), pre niekoho známa ako chutná burina, využívaná na prípravu šalátov, smoothies, pomazánok, do polievok alebo ako čaj, je bohatá na mnohé prospešné fytochemikálie, ale nikde sa nespomínajú inozitoly. Preto bolo cieľom tejto práce identifikovať, či *Stellaria media* obsahuje inozitoly a ktoré konkrétne druhy.

Materiál a metódy

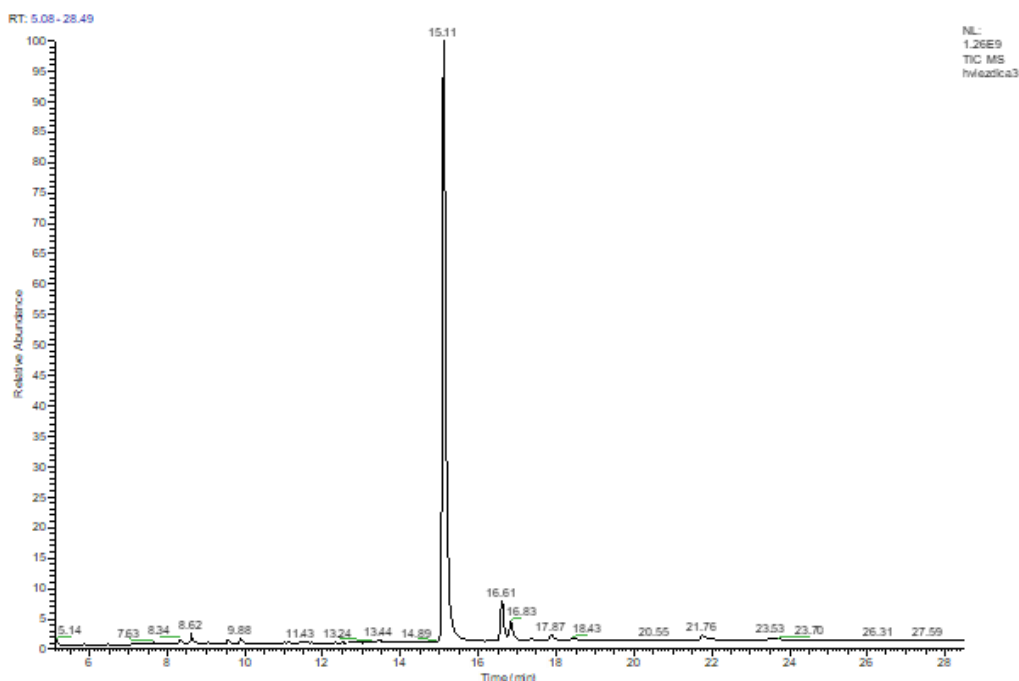
Listy hviezdice prostrednej (*Stellaria media*) boli lyofilizované, aby sa zachoval obsah látok v nich. Následne boli podrvené a extrahované v metanole. Extrakt bol homogenizovaný 30 min pri laboratórnej teplote ultrazvukovým homogenizátorom s pulzom 10 s x 1 s (Bandelin

Sonopuls HD 3100) pre lepšiu výťažok. Po 5 min vortexovaní (IKA Vortex Genius 3) a 5 min centrifugácii (Heraeus PICO 17 Centrifuge) sa odobratý 1 ml nechal odpariť. Vzorka sa pred analýzou GC-MS derivatizovala zásaditou acetyláciou pridaním 50 µl pyridínu a 50 µl acetanhydridu v termobloku (Block heater SBH130D STUART) 1 hod pri 80°C. Po acetylácii sa nechala vzorka odpariť do sucha a rozpustila v ACN.

Vzorky boli analyzované plynovým chromatografom v spojení s hmotnostným detektorom GC-MS (Trace GC Ultra Thermo Scientific - TSQ Quantum XLS) s použitím kremennej kapilárnej kolóny SP-2330 (30m x 0.25mm x 0.2µm) a teplotným gradientom: 180 °C (4 min) – 20 °C/min – 230 °C – 2 °C/min – 250 °C (10 min). Tieto podmienky boli optimalizované a teplotný program dosahuje najlepšiu separáciu. Prietok hélia bol 0,6 ml/min, teplota iónového zdroja a dávkovača bola 200 °C a 240 °C. Použitá bola elektrónová ionizácia (70 eV) a kvadrupólový analyzátor operoval vo full scan móde v hmotnostnom rozsahu 40-450 m/z.

Výsledky a diskusia

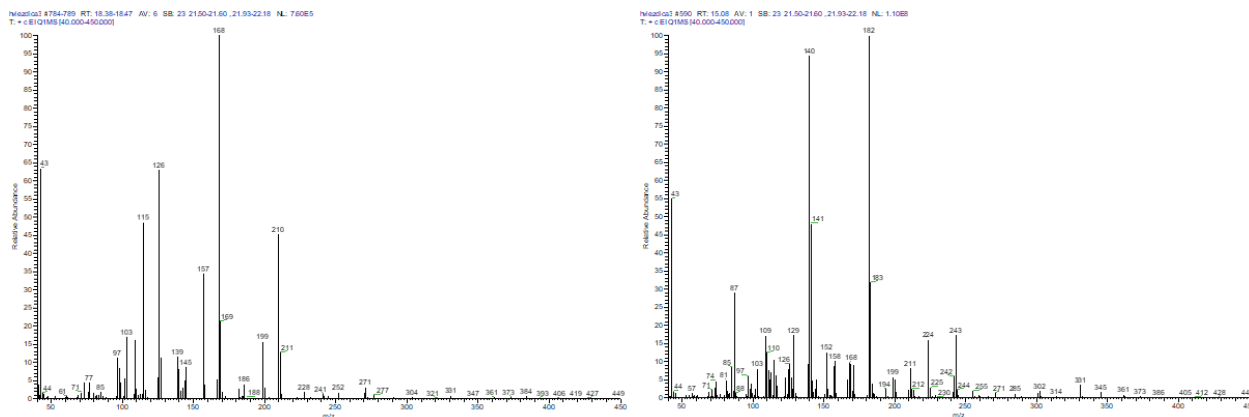
Separáciou extraktu *Stellarie media* plynovou chromatografiou sa získal chromatogram eluovaných inozitolov, ktoré boli potvrdené hmotnostnými spektrami a retenčnými časmi rovnako pripravených nameraných štandardov. V študovanej rastline bol identifikovaný 1 inozitol a 2 metyléter inozitoly, ktoré sa pravdepodobne nachádzajú v rastline vo voľnej forme.



Obr.1: GC-MS chromatogram eluovaných inozitolov, metyl-éter derivátov z extraktu listov *Stellarie media* na kolóne SP-2330, identifikovaných hmotnostným spektrometrom s trojitým kvadrupólom v elučnom poradí: D-pinitol (15,11 min), ononitol (17,87 min), myo-inozitol (18,43 min). V analyzovanom extrakte listov boli identifikované aj acetylované hexózy (16,61 min a 16,83 min).

Tab.1: Relatívne percentá [%] zastúpenia jednotlivých inozitolov v listoch *Stellarie media*

	RT [min]	Plocha [%]
D-pinitol	15,11	98,69
ononitol	17,87	0,99
myo-inozitol	18,43	0,33



Obr.2: MS spektrum acetylovaného inozitolu a metyléter inozitolu

Vo hviezdici prostrednej bol identifikovaný D-pinitol ako dominantný voči ďalším dvom inozitolom, ononitolu a myo-inozitolu. Možno skonštatovať, že okrem už známych fytochemikálií obsiahnutých v *Stellarii media* (saponíny, taníny, terpenoidy a i.) prispievajú k liečivým vlastnostiam tejto rastliny, používanej v kuchyni, aj inozitoly, najmä D-pinitol so svojimi inzulín-napodobujúcimi účinkami.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na COVID-19, ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA (Grant č. 2/0096/20).

Literatúra

- [1] Al-Suod H., Ligor M., Rațiu I.-A., et al. (2017) *Phytoch. Lett.* 20, p. 507
- [2] Sanz M. L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas M. V. (2008) *Food Chem.* 111, p. 778
- [3] Endringer D. C., Pezzuto J. M., Braga F. C. (2009) *Phytomed.* 16, p. 1064
- [4] Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta L. B., Ligor M., et al. (2018) *Nutrien.* 10, p. 1891

Inozitoly identifikované v kvetoch *Magnolia soulangeana* hmotnostnou spektrometriou s trojitým kvadrupólom

Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý¹

¹Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Inozitoly sa podieľajú na prenose niekoľkých endokrinných signálov, vrátane inzulínu, hormónov štítnej žľazy, gonadotropínov, lipidov s aktivitou podobnou hormónom (ako prostaglandíny) a mnohých ďalších endokrinných systémov [1].

Je preukázané, že myo-inozitol, či už samotný, alebo v kombinácii s jeho izomérom D-chiro-inozitolom, má rôzny účinok na zlepšenie symptómov u pacientiek s PCOS (*Syndróm polycystických vaječníkov*) [2]. Avšak správny pomer - t. j. príslušné percento myo-inozitolu ku D-chiro-inozitolu - je stále predmetom diskusie. V niekoľkých prípadoch nie je možné získať presvedčivé poznatky z klinických štúdií založených na nejasnom racionálnom dizajne, obmedzenom počte prijatých pacientiek a variabilnom zložení receptúry a dávkovaní. Celkovo údaje naznačujú, že použitie príslušných koncentrácií oboch izomérov by sa malo starostlivo zvážiť a nemalo by sa ponechať na improvizáciu. Preto je dôležité poznať zastúpenie jednotlivých izomérov inozitolu v rastlinnom materiáli. V budúcich štúdiách bude treba okrem toho zistiť molekulárny základ aktivity inozitolov na ovariálnych bunkách a preskúmať priaznivé účinky vhodného pomeru myo-inozitolu a D-chiro-inozitolu [1].

Magnólia Soulangeova (*Magnolia soulangeana*) je asi najviac pestovaným druhom ako okrasná drevina spomedzi mnohých druhov magnólií. Napriek tomu, že najznámejšia *Magnolia officinalis* je využívaná v tradičnej čínskej medicíne pre svoje bioaktívne neolignany, našim cieľom bolo identifikovať iné prospešné fytochemikálie, inozitoly, vo viac dostupnom druhu, *Magnolia soulangeana*, čím by sa mohla stať ešte zaujímavejším druhom.

Materiál a metódy

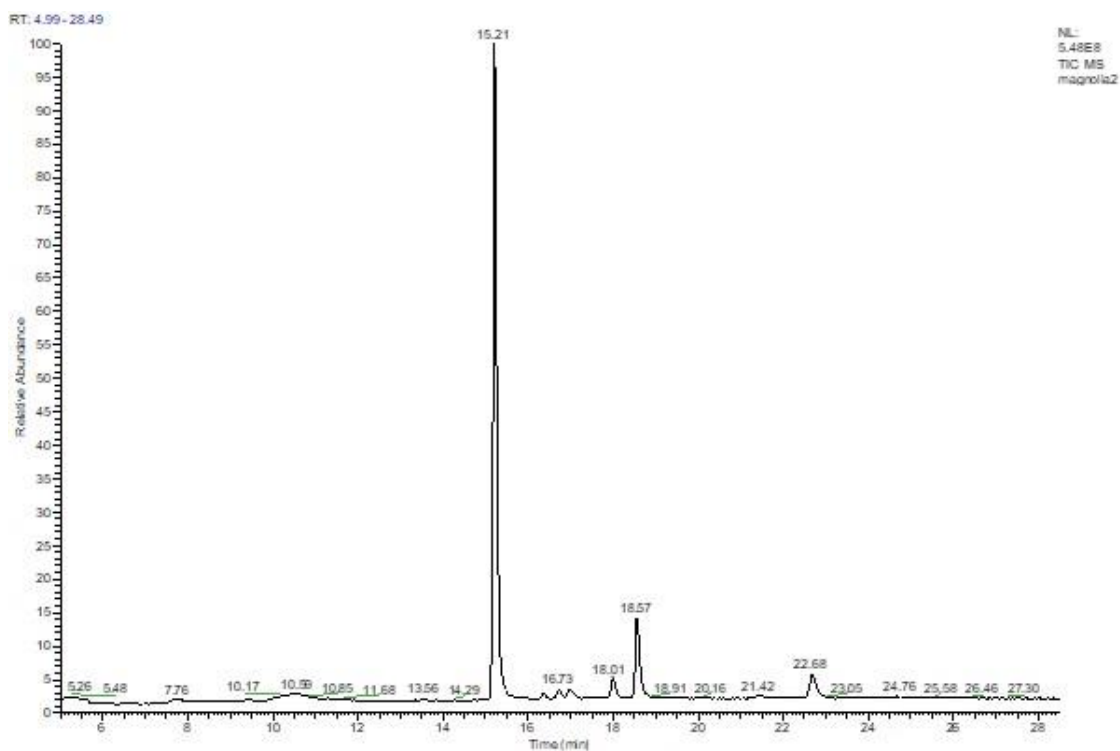
Kvety magnólie Soulangeova (*Magnolia soulangeana*) boli lyofilizované, aby sa zachoval obsah látok v nich. Následne boli podrvené a extrahované v metanole. Extrakt bol homogenizovaný 30 min pri laboratórnej teplote ultrazvukovým homogenizátorom s pulzom 10 s x 1 s (Bandelin Sonopuls HD 3100) pre lepší výťažok. Po 5 min vortexovaní (IKA Vortex Genius 3) a 5 min centrifugácii (Heraeus PICO 17 Cemtrifuge) sa odobratý 1 ml nechal odpariť. Vzorka sa pred analýzou GC-MS derivatizovala zásaditou acetyláciou pridaním 50 µl pyridínu a 50 µl acetanhydridu v termobloku (Block heater SBH130D STUART) 1 hod pri 80°C. Po acetylácii sa nechala vzorka odpariť do sucha a rozpustila v ACN.

Vzorky boli analyzované plynovým chromatografom v spojení s hmotnostným detektorom

GC-MS (Trace GC Ultra Thermo Scientific - TSQ Quantum XLS) s použitím kremennej kapilárnej kolóny SP-2330 (30m x 0.25mm x 0.2µm) a teplotným gradientom: 180 °C (4 min) – 20 °C/min – 230 °C – 2 °C/min – 250 °C (10 min). Tieto podmienky boli optimalizované a teplotný program dosahuje najlepšiu separáciu. Prietok hélia bol 0,6 ml/min, teplota iónového zdroja a dávkovača bola 200 °C a 240 °C. Použitá bola elektrónová ionizácia (70 eV) a kvadrupólový analyzátor operoval vo full scan móde v hmotnostnom rozsahu 40-450 m/z.

Výsledky a diskusia

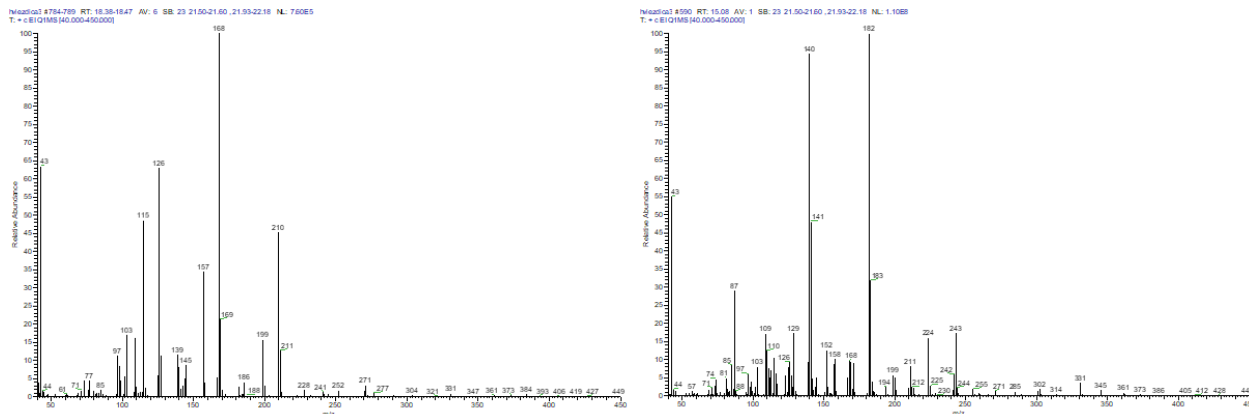
Separáciou extraktu *Magnolia soulangeana* plynovou chromatografiou sa získal chromatogram eluovaných inozitolov, ktoré boli potvrdené hmotnostnými spektrami a retenčnými časmi rovnako pripravených nameraných štandardov. V študovanej rastline boli identifikované 2 inozitoly a 2 metyléter inozitoly, ktoré sa pravdepodobne nachádzajú v rastline vo voľnej forme.



Obr.1: GC-MS chromatogram eluovaných inozitolov, metyl-éter derivátov z extraktu kvetov *Magnolia soulangeana* na kolóne SP-2330, identifikovaných hmotnostným spektrometrom s trojitým kvadrupólom v elučnom poradí: D-pinitol (15,21 min), chiro-inozitol (16,36 min), ononitol (18,01 min), myo-inozitol (18,57 min). V analyzovanom extrakte kvetov boli identifikované aj acetylované hexózy (16,73 min a 16,97 min).

Tab.1: Relatívne percentá [%] zastúpenia jednotlivých inozitolov v extraktoch listoch *Magnolia soulangeana*

	RT [min]	Plocha [%]
D-pinitol	15,21	84,33
chiro-inozitol	16,36	0,71
ononitol	18,01	2,73
myo-inozitol	18,57	12,22



Obr.2: MS spektrum acetylovaného inozitolu a metyléter inozitolu

V magnólii Soulangeova bol identifikovaný D-pinitol ako dominantný voči ďalším trom inozitolom, ononitolu, chiro- a myo-inozitolu. Ako druhý je najviac zastúpený myo-inozitol (12,22 %), ktorý sa v prírode najviac vyskytuje. Potom ononitol s 2,73 % a chiro-inozitol s 0,71 %-ným zastúpením v extrakte. Tak ako je využívaná *Magnolia officinalis* s obsahom neolignanov v tradičnej čínskej medicíne na zlepšenie gastrointestinálnej aktivity, regulácie respiračnej aktivity pri astme, kašli, ale aj pri liečení ochorenia COVID-19, možno predpokladať, že *Magnolia soulangeana* by mohla mať tiež potencionálne liečivé účinky vďaka inozitolom, ktoré majú antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na COVID-19, ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA. (Grant č. 2/0096/20)

Literatúra

- [1] Monastra G, Vucenik I, Harrath AH, Alwasel SH, Kamenov ZA, Laganà AS, Monti N, Fedeli V and Bizzarri M (2021) Front. Endocrinol. 12, p. 660381
- [2] Lagana AS, Garzon S, Casarin J, Franchi M, Ghezzi F. (2018) Trends Endocrinol Metab 29, p.768

Deficit prolíndehydrogenázy: Metodika na diagnostiku NMR spektroskopiou

Iveta Uhliariková¹, Mária Matulová¹, Anna Šalingová²

¹Chemický ústav SAV, v. v. i., Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemivuh@savba.sk

²Národný ústav detských chorôb, Oddelenie laboratórnej medicíny, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Deficit prolíndehydrogenázy (OMIM 170100) je veľmi zriedkavá autozomálne recesívna porucha metabolizmu kolagénu zapríčinená mutáciou PEPD (613230) génu na chromozóme 19q13. Kolagén je štruktúrny proteín, ktorý sa na konci svojho životného cyklu rozkladá na imidodipeptidy. Enzým prolíndehydrogenáza sa podieľa na degradácii imidodipeptidov obsahujúcich ako koncovú aminokyselinu prolín alebo hydroxyprolín. Štiepením väzby dochádza k uvoľneniu aminokyselín, ktoré môžu byť opätovne využité v bunkách. Nedostatok enzýmu sa prejavuje zvýšeným vylučovaním imidodipeptidov v moči. Charakteristickým klinickým prejavom tohto ochorenia bývajú chronické, pomaly sa hojace vredy a iné dermatologické prejavy; tvárový dysmorfizmus; mierna až ťažká mentálna retardácia. Časté sú aj opakujúce sa infekcie dýchacích ciest. Diagnostika je založená predovšetkým na prítomnosti a polohe vredov na koži, identifikácii konkrétnych proteínových markerov v moči alebo meraní aktivity prolidázy.

NMR spektroskopia je vysoko reprodukovateľná, nedeštruktívna analytická metóda nevyžadujúca úpravu vzorky. Na našom pracovisku ju využívame pri cielenej diagnostike rôznych zriedkavých dedičných metabolických ochorení na identifikáciu / kvantifikáciu charakteristických biomarkerov v telových tekutinách, pre ktoré nemá diagnostické centrum vhodnú metodiku. Cieľom tejto práce bolo vypracovať jednoduchý a rýchly metodický postup uplatnením ¹H NMR spektroskopie na identifikáciu prítomnosti signálov imidodipeptidov v moči, ktoré sú charakteristickými biomarkermi deficitu prolíndehydrogenázy.

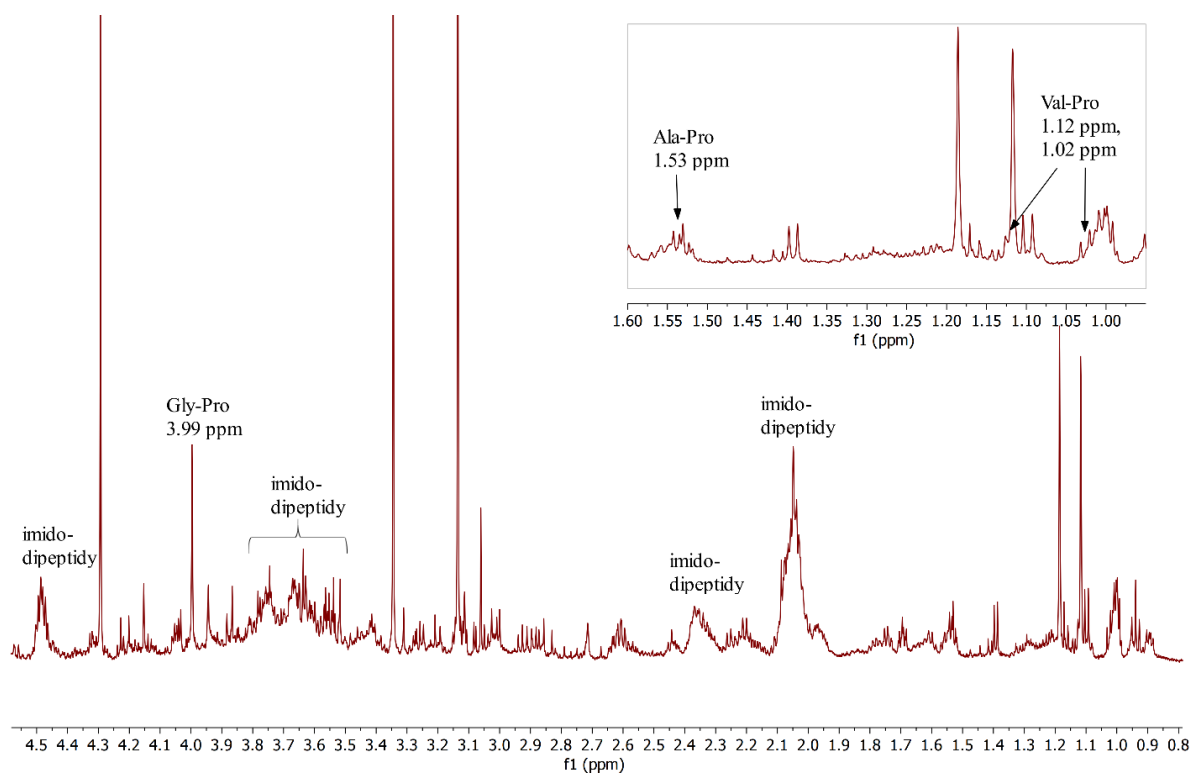
Materiál a metódy

Vzorka moču anonymného detského pacienta s deficitom prolidázy bola poskytnutá Centrom dedičných metabolických ochorení, Národného ústavu detských chorôb v Bratislave. Po odbere bola skladovaná pri teplote -20 °C. Moč bol rozmrazený tesne pred analýzou a centrifugovaný pri 13000 g po dobu 5 minút. 100 µl supernatantu moču bolo zmiešaných s 200 µl fosfátového pufru (pH 2.5) a 20 µl 10mM roztoku TSP-d₄ (sodná soľ 3-(trimetylsilyl)-propiónovej kyseliny-d₄).

¹H NMR spektrum bolo merané pri teplote 25 °C v 3-mm kyvete na 600MHz spektrometri Varian VNMRS vybaveného kryo sondou HCN ¹³C so zvýšenou toleranciou na prítomnosť solí, chladenou kvapalným héliom. Signál vody bol potlačený presaturáciou sekvenciou *presat*. Chemické posuny metabolitov boli kalibrované na interný štandard TSP (0 ppm).

Výsledky a diskusia

V ^1H -NMR spektre vzorky moču sú viditeľné charakteristické chemické posuny imidodipeptidov v oblastiach δ_{H} 1.9-2.4, δ_{H} 3.4-3.8 a δ_{H} 4.4-4.55 ppm. V spektre sú prítomné aj ďalšie signály dipeptidov, charakteristické pre deficit prolín-dehydrogenázy: singlet glycín-prolín (Gly-Pro) (δ_{H} 3.99 ppm), dublet alanín-prolín (Ala-Pro) (δ_{H} 1.53 ppm) a valín-prolín (Val-Pro) (δ_{H} 1.12 a 1.02 ppm). Analýza ^1H -NMR spektra vzorky moču potvrdila, že moč obsahuje metabolity charakteristické pre deficit prolidázy a potvrdzuje toto ochorenie.



Obr.1: Vybraná oblasť ^1H NMR spektra analyzovanej vzorky moču. Ala: alanín, Gly: glycín, Pro: prolín, Val: valín

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

Engelke U.F.H., Moolenaar S.H., Hoenderop S.M.G.C., Morava E. van der Graaf M., Heerschap A., Wevers R.A. Handbook of ^1H -NMR spectroscopy in inborn errors of metabolism: body fluid NMR spectroscopy and in vivo MR spectroscopy. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, 2007, ISBN 3-936145-49-0.

On the Identification and Spontaneous Decomposition of Two Galloyl Depsides from *Pistacia atlantica* Desf.

Michal Šoral¹, Sultan Pekacar², Didem Şöhretoğlu³, Didem Deliorman Orhan²

¹ Analytical Department, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovak Republic

² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Taç Sokağı No:3, TR-06330 Ankara, Turkey

³ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Sıhhiye Campus, TR-06100 Ankara, Turkey

Introduction

Pistacia atlantica Desf. is a pistachio tree, whose subspecies naturally grow in parts of the Middle-East and in North Africa. In contrast to *Pistacia vera*, which is widely known for its edible fruits (nuts), the importance of *Pistacia atlantica* lies in its resin and essential oil, and in the application of its parts in traditional medicine. Extracts and chemical compounds isolated from different parts of the plant were reported to possess anti-bacterial, anti-fungal, anti-inflammatory, anti-diabetic, wound healing, and other activities.[1,2] The leaves of *Pistacia atlantica* are known have a very high content of tannins and depsides, with several of them being derivatives of gallic acid. In this work the isolation of a mixture of *meta*-digallic acid methyl ester (**1**) and *para*-digallic acid methyl ester (**2**) from *Pistacia atlantica* is briefly described, together with details about the identification process and its spontaneous decomposition.

Materials and Methods

Dried and ground *P. atlantica* leaves were extracted with 100% methanol for 24 hours using a mechanical mixer. This process was repeated five times. The extract filtered through filter paper was concentrated to dryness in a rotary evaporator at a temperature not exceeding 45 °C. The crude extract was suspended in 90% methanol and then fractionated with solvents of increasing polarity with *n*-hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), and *n*-butanol/saturated with water (*n*-BuOH). An α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity-directed fractionation study was performed on the *P. atlantica* sub-extracts with the EtOAc sub-extract being the most potent amongst them. The EtOAc sub-extract was repeatedly subjected to column chromatography (polyamide, RP-18, Sephadex LH-20) whilst targeting compounds with the inhibitory activity. As a result, a mixture of *meta*-digallic acid methyl ester (**1**) and *para*-digallic acid methyl ester (**2**) was isolated. The complete details about of the purification of **1** and **2** will be additionally published with the isolation data of co-isolated compounds from *P. atlantica*. The data are available from the first author on request.

All presented NMR spectra were recorded on an Avance III HD NMR spectrometer (Bruker) operating at frequencies of 400 MHz for ^1H nuclei and 101 MHz for ^{13}C nuclei. The spectrometer was equipped by a nitrogen-cooled Prodigy cryoprobe. The NMR sample of the mixture of **1** and **2** was prepared by dissolving approximately 15 mg of the mixture in 0.6 ml of CD_3OD with 0.03 % TMS (Eurisotop).

Results and Discussion

The ^1H NMR spectrum of the sample contained two sets of resolved signals with the integral intensity ratio between the two sets being approximately 5:2; the first set of signals contained two doublets ($J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz) with $\delta_{\text{H}} = 7.389$ and 7.264 ppm, one double-intensity singlet with $\delta_{\text{H}} = 7.222$ ppm, and a triple-intensity singlet with $\delta_{\text{H}} = 3.843$ ppm. From the coupling constant value and from the observed HMBC correlations it was determined that the two doublets belong to two protons bonded on a phenyl ring in a mutual *meta*-position. The elevated δ_{C} values of ^{13}C nuclei interacting with the abovementioned protons suggested the presence of a carbonyl moiety ($\delta_{\text{C}} = 168.28$ ppm) and three oxygen-containing substituents bonded to this aromatic ring. The carbonyl moiety was identified as a methyl ester thanks to the strong $^3J_{\text{CH}}$ interaction observed between the protons with $\delta_{\text{H}} = 3.843$ ppm and the carbon with $\delta_{\text{C}} = 168.28$ ppm. The identified methyl gallate fragment had to be asymmetrically substituted (i. e. not in the *para*-position relative to its carbonyl group) for its protons not to be identical.

From the matching integral intensities it was suggested that the protons with $\delta_{\text{H}} = 7.222$ ppm mentioned at the start of this paragraph belonged to the same compound and possibly belonged to a symmetric aromatic fragment (explaining the double-intensity). This was later proven by the acquisition of an HMBC spectrum with a prolonged time interval for the evolution of small $^nJ_{\text{CH}}$ interactions (the sequence was optimized for $J_{\text{CH}} = 3$ Hz) – a weak heteronuclear interaction could be easily spotted between protons with $\delta_{\text{H}} = 7.389$ and 7.264 ppm, and a carbonyl with $\delta_{\text{C}} = 166.65$ ppm. According to the observed HMBC interaction, the latter atom belonged to an aromatic ring containing the protons with $\delta_{\text{H}} = 7.222$ ppm. The same 2D spectrum, together with the 2D HSQC spectrum clearly proved the symmetry of this aromatic ring as the latter protons showed both a single-bond and a multiple-bond correlation with a carbon with $\delta_{\text{C}} = 110.84$ ppm. The singlet-shaped signal with $\delta_{\text{H}} = 7.222$ ppm was resolved as a doublet of a doublet in the ^{13}C -satellite spectrum ($^1J_{\text{CH}} = 162$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz). It was suggested that the aromatic cycle is another galloyl moiety, thus the compound being identified as *meta*-digallic acid methyl ester (**1**).

The minor signal set contained two singlet-shaped with $\delta_{\text{H}} = 7.104$ and 7.238 ppm, and a non-integer intensity singlet with $\delta_{\text{H}} = 3.865$ ppm. Thanks to the knowledge of the structure of the major compound it was suggested that the two singlet-shaped proton signals belong to two pairs of protons from two symmetric galloyl moieties, thus the signal $\delta_{\text{H}} = 3.865$ ppm actually being a standard triple-intensity -O-CH₃ group. With the same procedure the compound was identified as *para*-digallic acid methyl ester (**2**).

A set of signals that did not correspond with the ^1H and ^{13}C spectra was observed in the 2D NMR spectra measured afterwards (especially in the HMBC spectrum optimized for very small couplings that was measured a week after the sample preparation). A careful examination of a re-measured ^1H spectrum revealed the presence of an aromatic singlet shaped proton with $\delta_{\text{H}} = 7.048$ ppm and a methoxy-group with $\delta_{\text{H}} = 3.815$ ppm with non-corresponding integral intensities. Expectedly, the HMBC spectrum revealed that these signals belong to a symmetric galloyl moiety with $\delta_{\text{C}} = 52.32, 110.12$ (2C), $121.51, 139.82, 146.55$ (2C), and 169.09 ppm. No other correlation signals were obtained that would suggest a substitution of the aromatic ring; therefore, the compound was identified as methyl gallate (**3a**). The only discrepancy was found in the non-corresponding integral intensities of the two proton signals of the compound – the integral intensity ratio 4:3 was observed instead of 2:3 as would be expected for methyl gallate. It was revealed that the *meta*- and *para*-digallic acid methyl esters gradually decompose and form the additionally observed methyl gallate (see Figure 1).

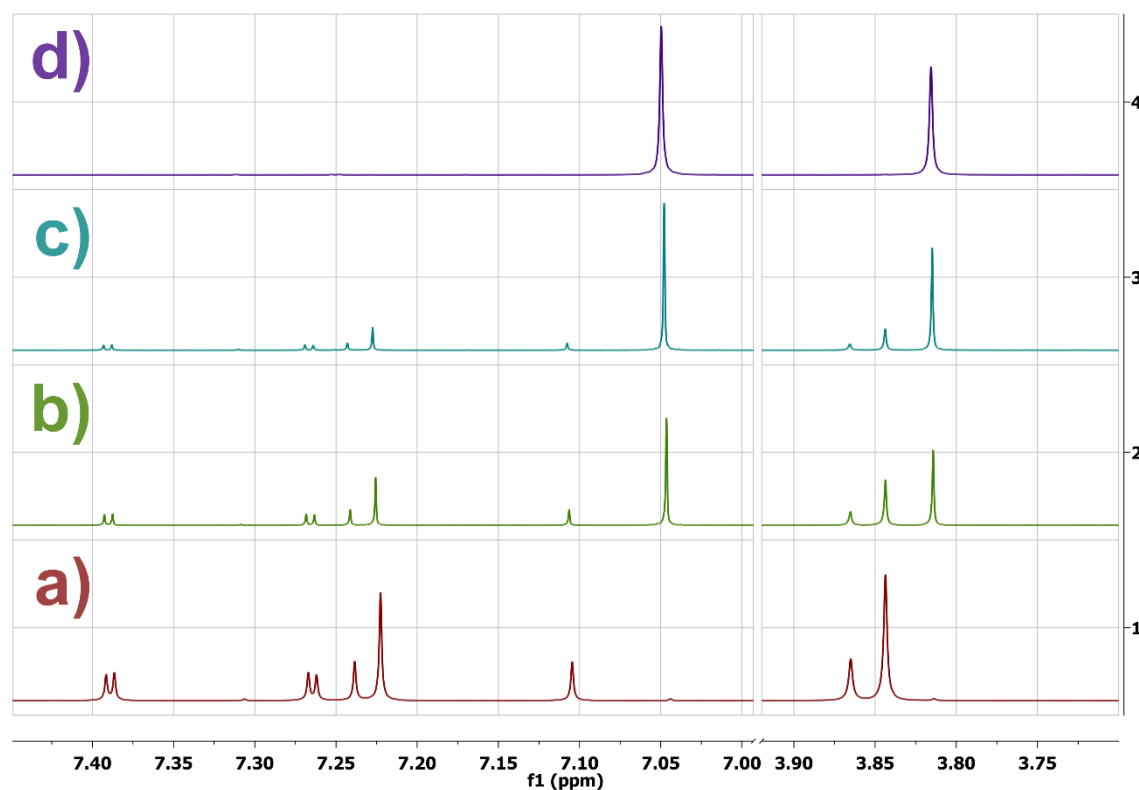


Fig. 1: The gradual decomposition of *o*- and *p*-digallic acid methyl ester as observed by ^1H NMR spectroscopy. The individual spectra have been measured a) immediately after sample preparation, b) after 4 days, c) after 7 days, and d) after 35 days of sample storage in varied temperatures (4°C - 25°C).

The reason of the abovementioned integral ratio could be explained by the analysis of the mechanism of the formation of the new compound. It was suggested that the digallic acid methyl esters **1** and **2** undergo an alcoholysis (transesterification) by the NMR solvent (MeOH- d_4), see Figure 2. If a standard transesterification mechanism is assumed, statistically, half of the methyl groups of the formed methyl gallate molecules must be fully deuterated – this is in complete accordance with the integral intensity ratio mentioned in the previous paragraph. Also, the ^1H NMR spectra suggest that the originally present methyl ester groups do not undergo transesterification by MeOH- d_4 as the methyl group's ^1H signal would have statistically had to disappear, and a large quantity of CH_3OD would be detected – both phenomena were not observed. This implies that the initial ionization of **1** and **2** at the depside bond is extremely favored over the ionization of the methyl ester bond of **1**, **2** or **3a**. The reason of such behavior remains unclear; such data suggest that the deuteron could be obtained by an intramolecular transfer from the hydroxy-group bonded to the *ortho*-position relative to the depside linking group *via* a 7-membered cycle. The presence of **3b** was later confirmed by the observation of several ^{13}C signals shifted by isotope effects and the $^1J_{\text{CD}}$ interaction within its trideuteromethyl group.

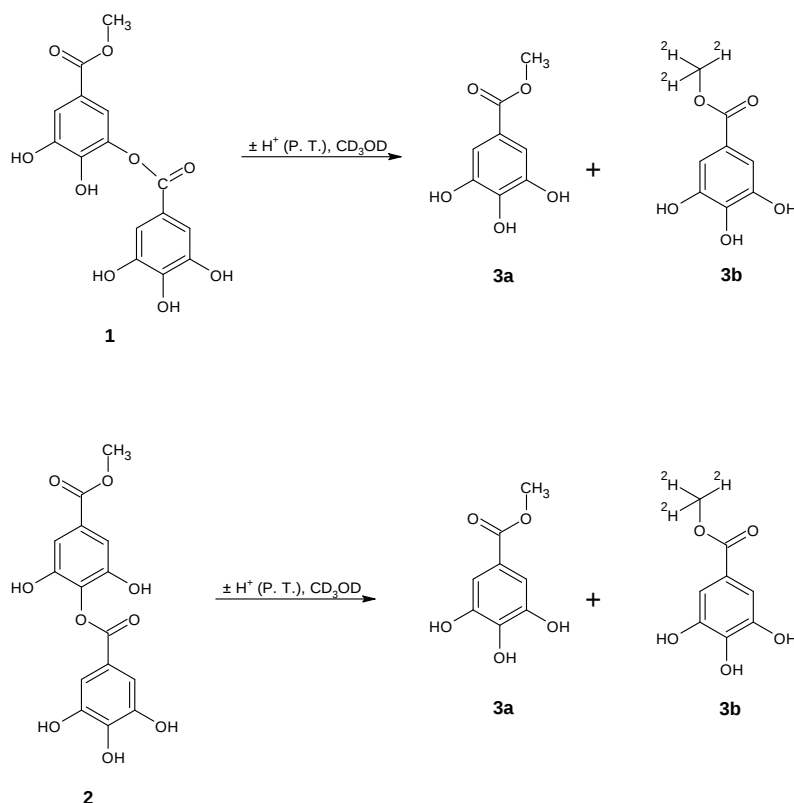


Fig. 2: The decomposition of **1** and **2** in CD_3OD with the formation of methyl gallate (**3a**) and trideuteromethyl gallate (**3b**). The source of the proton (or deuteron) needed in the initial ionization step was omitted on purpose, because of the existence of ambiguous explanations of this reaction step. P. T. = Proton Transfer.

To our knowledge, the compounds **1** and **2** were only characterized by NMR in a 7:3 mixture isolated from Panamanian plants by Guldbrandsen et al.[3] Pierson et al. claims to have detected the both compounds in mango fruit using HPLC-MS.[4] The depside bond cleavage is commonly used to obtain gallic acid from gallotannins, but depsidases (tannases) are employed for the catalysis of the ester hydrolysis. The possibility of a spontaneous hydrolysis/alcoholysis can play a negative role in any application of compounds **1** and **2** as drugs. Despite this finding, the mixture of compounds was found to have inhibitory activity against α -amylase and α -glucosidase during the extract fractionation, and the mixture is undergoing pharmaceutical profiling.

Acknowledgements

Sultan Pekacar was granted by TÜBİTAK 2211-A National PhD Scholarship Program.

This work was a part of the project: ‘Türkiye’de Yetißen Bazı *Pistacia* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar’(Gazi University Scientific Research Project, 02/2019-32).

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Development of products by modification of natural substances and study of their multimodal effects on COVID-19, ITMS: 313011ATT2, co-financed by the European Regional Development Fund.

Literature

[1] H. Benamar, A. Marouf, M. Bennaceur, Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* from Algeria. *J. Herbs, Spices, Med. Plants* 2018, vol. 24, iss. 3, pp. 229-244.

[2] Z. Ben Ahmed, M. Yousfi, J. Viaene, B. Dejaegher, K. Demeyer, Y. V. Heyden, Four *Pistacia atlantica* subspecies (*atlantica*, *cabulica*, *kurdica* and *mutica*): A review of their botany, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 2021, vol. 265, article number 113329.

[3] N. Guldbrandsen, M. De Mieri, M. Gupta, E. Liakou, H. Pratsinis, D. Kletsas, E. Chaita, N. Aliannis, A.-L. Skaltsounis, M. Hamburger, Screening of Panamanian plants for cosmetic properties, and HPLC-based identification of constituents with antioxidant and UV-B protecting activities. *Scientia Pharmaceutica* 2015, vol. 83, iss. 1, pp. 177-190.

[4] J. T. Pierson, G. R. Monteith, S. J. Roberts-Thomson, R. G. Dietzgen, M. J. Gidley, P. N. Shaw, Phytochemical extraction, characterisation and comparative distribution across four mango (*Mangifera indica* L.) fruit varieties. *Food Chem.* 2014, vol. 149, pp. 253-263.

Prítomnosť glukózy a inulínu v infúzii a výluhu z rastliny *Siraitia grosvenorii*

Viera Dujnič¹, Mária Matulová¹, Andrej Chyba¹, Vladimír Pätoprstý¹

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

Úvod

Siraitia grosvenorii, známa ako monkfruit alebo luohan guo, je bylinná trvalka z čeľade tekvicovité, Cucurbitaceae. Pochádza z južnej Číny. Rastlina sa pestuje pre svoj ovocný extrakt, obsahujúci mogrozidy, zlúčeniny, ktoré sú 250-krát sladšie ako sacharóza. Preto sa mogrozidový extrakt používa ako nízkokalorické sladidlo do nápojov a v tradičnej čínskej medicíne. Ich chemické zloženie v extrakte plodov *Siraitia grosvenorii* sa študuje častejšie ako v jej kvetoch, alebo bylinkovom čaji vyrobeného z tejto rastliny. Tie sa využívajú vo forme nálevov alebo odvarov v rámci bylinnej medicíny s potenciálne zdravím prospešným vplyvom. Mogrozidy majú byť zodpovedné za biologické aktivity *S. grosvenorii*; je však dobre známe, že polysacharidy môžu tiež vykazovať zaujímavé biologické aktivity. Zloženie purifikovaných polysacharidových komplexných matric, izolovaných z kvetov *S. grosvenorii* a bylinného čaju vo forme infúzie a odvaru, bolo cieľom našej nedávnej štúdie¹. V tejto práci predstavujeme závery analýzy ¹³C NMR spektier, ktoré boli merané zo surových vzoriek pred purifikáciou dialýzou.

Materiál a metódy

Kvety *Siraitia grosvenorii* (SGF) boli zakúpené od spoločnosti Shanghai Herbary Biotechnology Co., Ltd. s vyhlásením, že kvety boli zozbierané a voľne sušené na vzduchu v provincii Guangxi v 9/2015 v Číne. Bylinný čaj (SGHT) z *Siraitia grosvenorii*, zozbieraný 10/2015 v Yongfu, bol zakúpený od dodávateľa Guilin Yongfu Linzhongxian Momordica Grosvenori Co., Ltd.

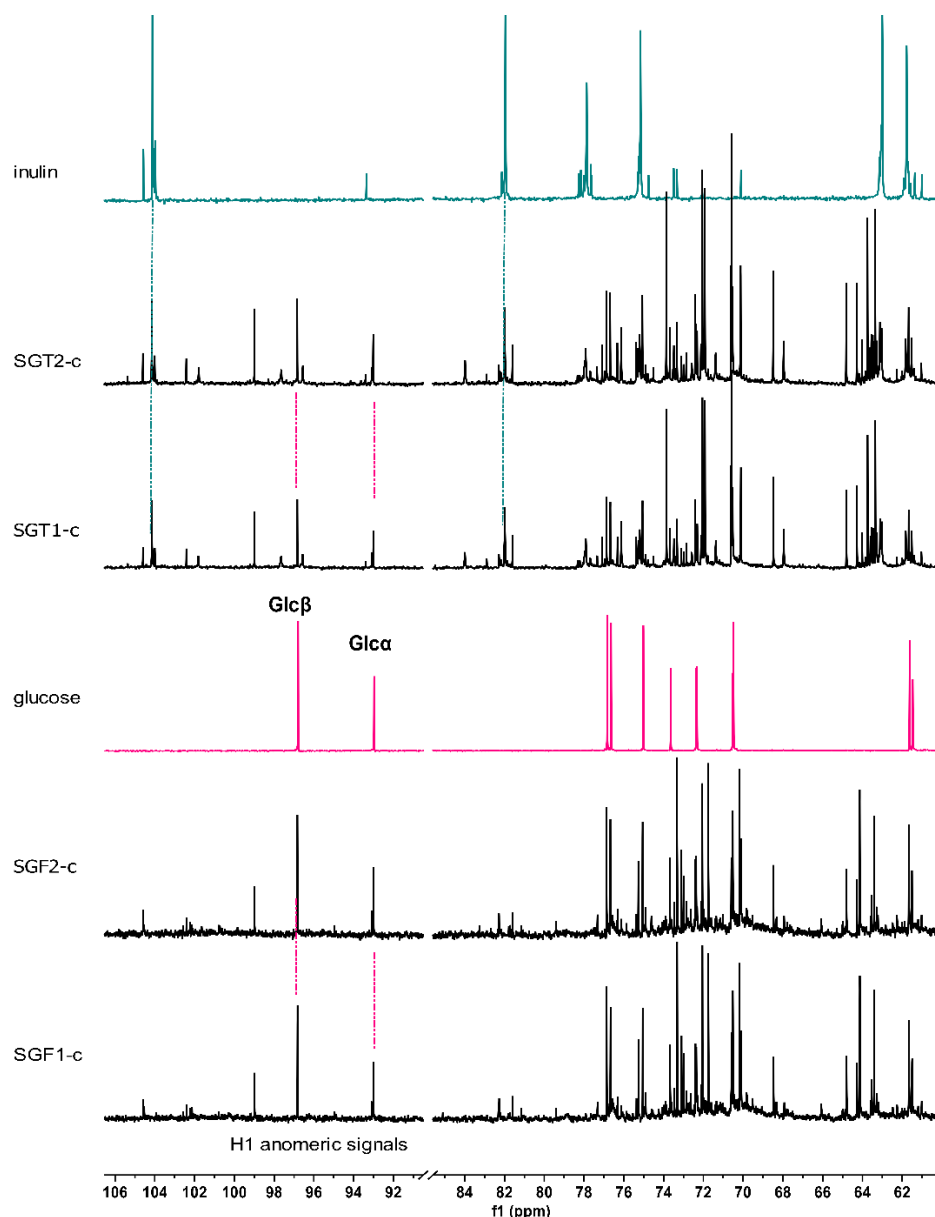
Vzorky na analýzu boli pripravené z kvetov *S. grosvenorii* (SGF) a bylinkového čaju (SGT) jednoduchou infúziou (300ml destilovanej vody, 95-100 °C, 20 g substrátu, 15 min; SGF1-c a SGT1-c) a ako odvar (300 ml destilovanej vody 100 °C/ 2h, 20 g; vzorky SGF2-c a SGT2-c) podľa postupov tradičnej čínskej medicíny^{2,3}. Pevné časti sa odfiltrovali a získané surové extrakty sa dialyzovali (MWCO 6-8 000; Spectra/Por, USA) počas 48 hodín. Získané vzorky boli lyofilizované.

NMR spektrá boli merané v D₂O pri 25 °C na 600MHz NMR spektrometri Bruker Avance III HD s H,C,N triple resonance kryo sondou.

Výsledky a diskusia

V našej predchádzajúcej práci sme sa venovali detailnej analýze chemického zloženia vzoriek získaných infúziou a vo forme odvaru po ich purifikácii dialýzou. Dialýzou boli z nich odstránené nízkomolekulové zložky, soli a nečistoty¹. Cenné informácie však poskytla aj analýza surových nepurifikovaných vzoriek pred dialýzou (SGT1-c a SGT2-c – z čaju; SGF1-c a SGF2-c z kvetov). Detailná analýza SGF1-c a SGF2-c ukázala, že v spektrách obidvoch vzoriek získaných z kvetov je dominantnou zložkou glukóza. NMR spektrá vzoriek z bylinkového čaju (SGT1-c a SGT2-c) potvrdzujú prítomnosť bohatšej zmesi látok, v ktorých je tiež prítomná glukóza ale aj inulín. Identifikácia iných látok bude možná až po ich separácii zo zmesí. Obr. 1 ukazuje porovnanie ¹³C NMR spektier analyzovaných vzoriek so spektrami štandardov: glukózy a inulínu. Prítomnosť

mogrozidov nebola jednoznačne potvrdená, aj keď bolo možné v HSQC spektrách identifikovať niektoré charakteristické signály glykozidicky viazaných glukózových jednotiek.



Obr.1 ^{13}C NMR spektrá analyzovaných surových vzoriek pred dialýzou získaných z kvetov a bylinkového čaju *S. grosvenori*: SGT1-c a SGT2-c – z čaju, SGF1-c a SGF2-c – z kvetov. Spektrá sú porovnané so spektrami štandardov, inulínu a glukózy.

Získané výsledky môžu mať význam pre pacientov s diabetom, u ktorých pitie infúzie alebo výluhu z *S. grosvenori* potenciálne môže ovplyvniť hladinu glukózy v krvi. Prítomný inulín vo vzorkách z bylinkového čaju pôsobí ako prebiotikum.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na COVID-19, ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA. (Grant č. 2/0096/20)

Literatúra

¹Dujnič, Viera; Matulová, Mária; Chyba, Andrej; Patoprsty, Vladimír. (2020). Polysaccharides in *Siraitia grosvenori* flowers and herbal tea. Chemical Papers 75. 1-11. 10.1007/s11696-020-01347-3.

²Liu, Qihua; Wen, Jin; Peng, Zhiping; Liu, Fenglin; Tong, Xiaolin. (2015). Review of the powder and decoction formulae in Traditional Chinese Medicine based on pharmacologically active substances and clinical evidence. Journal of Traditional Chinese Medicine 35. 355-60. 10.1016/S0254-6272(15)30110-2.

³Gong, Xue; Chen, Namuhan; Ren, Kai; Jia, Junying; Wei, Kunhua; Zhang, Le; Lv, Ying; Wang, Jianhua; Li, Minhui. (2019). The Fruits of *Siraitia grosvenorii*: A Review of a Chinese Food-Medicine. Frontiers in Pharmacology 10. 1400. 10.3389/fphar.2019.01400.

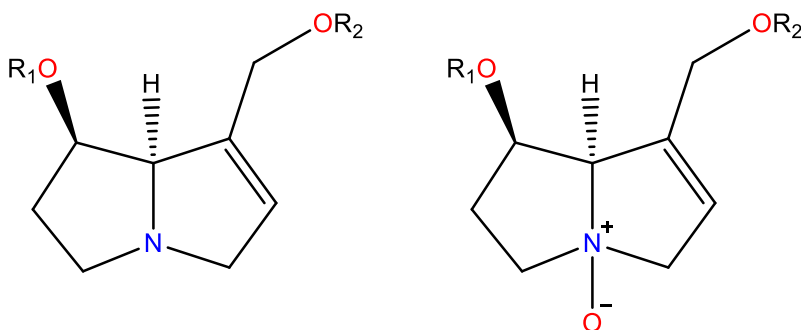
Stanovenie vybraných pyrolizidínových alkaloidov v suchých rastlinných extraktoch pomocou HPLC-MS

Andrej Chyba, Viera Dujnič, Vladimír Pätoprstý

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Pyrolizidínové alkaloidy (PA) sú heterocyklické dusík obsahujúce organické zlúčeniny (Obr. 1). V prírode sa vyskytujú vo viac ako 6 000 rastlinách (veľké zastúpenie druhov z čeľadi *Boraginaceae*, *Asteraceae* a *Fabaceae*). Mnohé z týchto rastlín sú bežné buriny, ktoré môžu pri zbere kontaminovať suroviny rastlinného pôvodu používané na výrobu čajov, extraktov, tinktúr alebo liečiv (Prakash et al., 1999). PA sú syntetizované v koreňoch rastlín ako N-oxidy a transportované do zvyšku rastliny, kde sa hromadia v kvetoch, stonkách a listoch. Pôsobia ako veľmi účinné prostriedky na odpudzovanie hmyzu, ale na človeka majú niektoré z nich karcinogénny a hepatotoxický účinok najmä 1,2-nenasýtené necínové bázy, ale aj ich N-oxidové formy (Seremet et al., 2018). Väčšina rastlín produkuje zmesi PA v rôznych koncentráciách v rozmedzí od menej ako 0,001 % do 5 % (až do 19 % suchej hmotnosti) (EFSA 2011). Z dôvodu toxicity PA a zvýšeného rizika ohrozenia zdravia obyvateľov boli vypracované rizikové štúdie a na základe nich vydali európske liekové a potravinové authority nariadenia na kontrolu obsahu PA v rastlinných produktoch (EFSA 2016; EFSA 2017a; EFSA 2017b). Zároveň boli stanovené odporúčané maximálne hodnoty denného príjmu a tiež obsahu týchto alkaloidov v rastlinných a živočíšnych produktoch (EMA 2021). Vznikla tak potreba presného a citlivého stanovenia obsahu PA v rôznych komplexných matriciach. Na tento účel sa javí ako veľmi vhodná metóda hmotnostnej detekcie meraním vybraných iónov a ich charakteristických iónových fragmentov v kombinácii s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.



Obrázok 1 Chemická štruktúra 1,2-nenasýtených pyrolizidínových alkaloidov (vľavo) a ich N-oxidov (vpravo)

Materiál a metódy

Suché extrakty rastlín rumanček, púpava, fenikel, ruža šípová a ibišteľ boli dodané firmou Calendula, Slovensko. Vybrané štandardy pyrolizidínových alkaloidov boli zakúpené od firmy PhytoLab, Nemecko. Kvapalinová chromatografia sa merala na prístroji Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (ThermoFisher Scientific, Nemecko) s degaserom, kvartérnou pumpou, autosamplerom a vyhrievaným kolónovým priestorom. Detekcia sa vykonávala pomocou hmotnostného detektora AB Sciex Qtrap 4500 (Sciex, USA) s trojitým kvadrupólom a

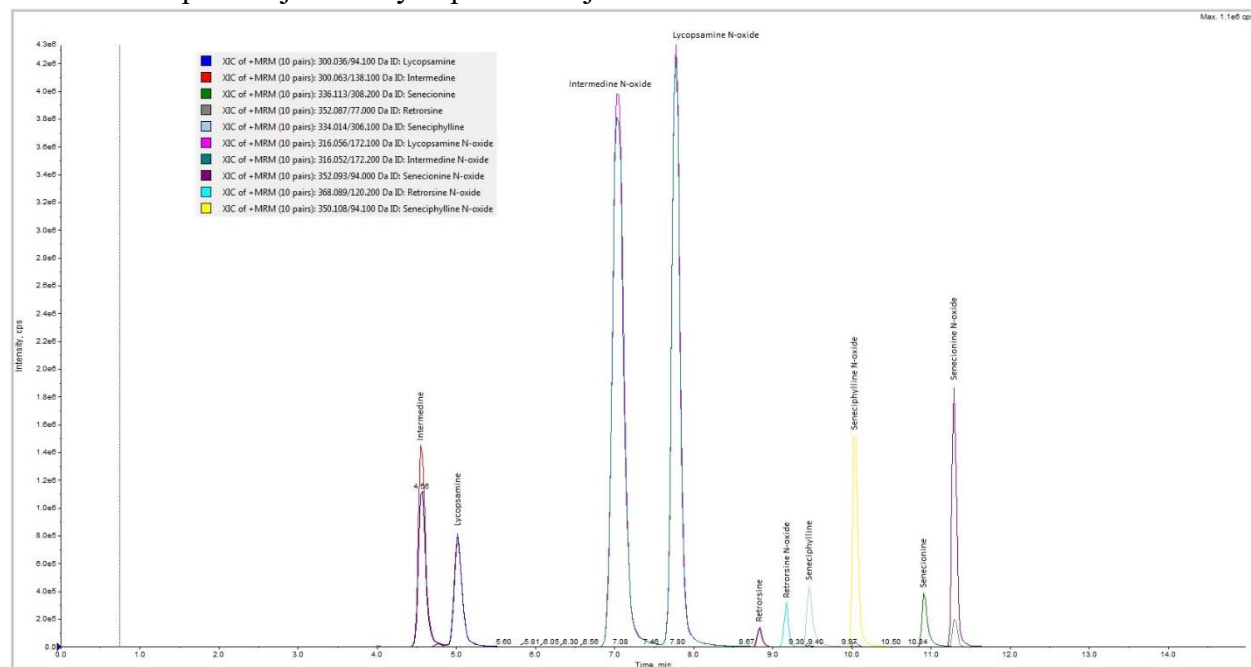
elektrosprejovou ionizačnou hlavicom. Alkaloidy sa zo suchého extraktu extrahovali pomocou 0,5% kyseliny mravčej za stáleho miešania (1500 rpm) a ohrevu (80°C) dva krát po 10 minút. Následne bol roztok ochladený na laboratórnu teplotu a prefiltrovaný cez 25 mm striekačkový filter HPTFE s veľkosťou pórov 0,22 µm. Vzorka bola nastrekovaná v objeme 10 µl a separácia prebiehala na kolóne Phenomenex Luna Omega 3 µm PS C18 100 Å, 150 x 4,6 mm s predkolónou Security Guard PS C18 4 x 3,0 mm. Teplota kolónového priestoru bola nastavená na 35°C a konštantný prietok na 1 ml/min. Elúcia sa dosahovala gradientom dvoch fáz: 0,5% kyseliny mravčej a metanolu. Ich vzájomný percentuálny pomer je popísaný v tabuľke č. 1. Detektor meral v pozitívnom móde a parametre iónového zdroja boli nastavené nasledovne CUR: 25.00, IS: 5500.00, TEM: 600.00, GS1: 60.00, GS2: 60.00, CAD: Medium, EP: 10.00.

Tabuľka 1 Časový rozpis elučného gradientu

Čas (min)	0,5% Kyselina mravčia	Metanol
0	91%	9%
5	91%	9%
15	50%	50%
18	0%	100%
20	0%	100%
22	91%	9%
25	91%	9%

Výsledky a diskusia

Vybrané štandardy pyrolizidínových alkaloidov sa presne navážili a rozpustili v metanole. Následne sa pripravil zmesný 10-zložkový štandard, ktorý sa ďalej podľa potreby riedil. Optimalizáciou chromatografických podmienok, hlavne elučného gradientu, sa dosiahla dostatočná separácia jednotlivých píkovo ako je vidieť na obrázku č. 2.



Obrázok 2 Chromatografický záznam zmesného 10-zložkového štandardu pyrolizidínových alkaloidov

Kvôli komplexnosti matrice rastlinných extraktov a jej možnému negatívne vplyvu na kvantitatívne stanovenie PA bola použitá metóda prídavku štandardu v dvoch rôznych koncentráciách. Pomocou lineárnej regresie sa potom vypočítala koncentrácia jednotlivých pyrolizidínových alkaloidov v suchých rastlinných extraktoch. Hodnoty sú uvedené v tabuľke č. 2.

Tabuľka 2 Hodnoty jednotlivých pyrolizidínových alkaloidov v suchých rastlinných extraktoch

	Suchý extrakt, koncentrácia PA v µg/kg (ppb)				
Názov PA	Rumanček	Púpava	Fenikel	Ruža šíповá	Ibišteľ
Intermedine	2,77	172,55	0,8	0,91	3,07
Lycopsamine	4,56	68,75	1,99	0,69	0,74
Retrorsine	40,99	>0,6	>1,38	0	>1,35
Seneciphylline	>0,5	2,5	0,75	0,81	0
Senecionine	>0,4	>0,3	0	0	0
Intermedine N-oxide	>0,2	0	0	0	0
Lycopsamine N-oxide	>0,2	0	0	0	0,48
Retrorsine N-oxide	69,93	14,72	>1,14	11,39	>1,11
Seneciphylline N-oxide	>0,3	>0,3	0	>0,68	6,34
Senecionine N-oxide	14,17	>0,3	5,91	>0,70	11,77
Spolu	>134,0	>260,0	>12,0	>15,2	>25,0

Najnižšiu koncentráciu (12,0 µg/kg) desiatich vybraných PA obsahoval suchý extrakt feniklu a naopak najvyššiu koncentráciu (260,0 µg/kg) obsahoval extrakt púpavy. Podľa vykonávacieho nariadenia Európskej komisie z 11. decembra 2020 sa stanovila maximálna hodnota sumy 21 pyrolizidínových alkaloidov obsiahnutých v bylinných nálevoch (sušený produkt) na 200 µg/kg (Komisia EÚ, 2020). Aj keď analýza neobsahuje hodnoty ostatných PA, v prípade púpavového extraktu stanovená koncentrácia 10 vybraných alkaloidov už prekračuje maximálnu povolenú hodnotu.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na COVID-19, ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA. (Grant č. 2/0096/20)

Literatúra

Prakash A.S., Pereira T.N., Reilly P.E., Seawright A.A.: Pyrrolizidine alkaloids in human diet. Mutation Research 1999, 443, pp. 53-67

Seremet O., Olaru O., Gutu C., Nitulescu G., Ilie M., Negres S., Zbarcea C., Purdel C., Spandidos D., Tsatsakis A., Coleman M., Margina D.: Toxicity of plant extracts containing pyrrolizidine alkaloids using alternative invertebrate models. Molecular Medicine Reports 2018, 17, pp. 7757-7763

EFSA 2011. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA Journal 9 (11): 2406, 134. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2406>

EFSA 2016. Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. EFSA Journal 14(8):4572, 50. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.EFSA.2016.4572>

EFSA 2017a. Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. EFSA Scientific Committee. EFSA Journal, 15(1):4658, 41. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.EFSA.2017.4658>

EFSA 2017b. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. EFSA EFSA CONTAM Panel (Panel on Contaminants in the Food Chain). EFSA Journal, 15(7):4908, 34. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.EFSA.2017.4908>

EMA 2021. Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) including recommendations regarding contamination of herbal medicinal products with PAs. EMA/HMPC/893108/2011. Dostupné na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-use-herbal-medicinal-products-containing-toxic-unsaturated-pyrrolizidine-alkaloids_en-0.pdf

Komisia EÚ 2020. Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2020/2040 z 11. decembra 2020, ktorým sa mení nariadenie (ES) č. 1881/2006, pokiaľ ide o maximálne hodnoty pyrolizidínových alkaloidov v určitých potravinách. C/2020/8665, Ú. v. EÚ L 420, 14.12.2020, s. 1 – 4. Dostupné na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2020.420.01.0001.01.SLK&toc=OJ%3AL%3A2020%3A420%3ATOC

Experimental and theoretical study of inhomogeneous lyophilization

Krošláková S¹., Klčová K²., Matejčíková A²., Kopáčová M³., Pätoprstý V³., Rajniak P^{1,2}

¹ Sitno Pharma, Ltd., Rybné námestie 4135/1, 811 02 Bratislava

² Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 2101/9, 812 37 Bratislava

³ Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

Lyophilization is a standard and key unit operation in the production of aseptic powdered drugs. In the pharmaceutical industry, lyophilization is used to dry and stabilize a large group of drugs that must be administered intravenously, such as vaccines or antibiotics. The freeze-drying cycle involves three main steps: the freezing step, during which the product is completely solidified; primary drying (sublimation phase) during which the solvent (usually water) is removed by sublimation and secondary drying (desorption phase), where the aim is to achieve acceptable residual moisture content in the product. There are several possible reasons that affect the drying rate in the vials, such as the heat transfer through the walls of the lyophilizer, the different design of the heating shelves in the lyophilization equipment, and finally, the packing density of the vials.

The aim of the work was an experimental and theoretical study of inhomogeneous lyophilization. The experimental part was performed at the Department of Chemical and Biochemical Engineering of the Faculty of Chemical and Food Technology, (ÚChEI FChPT). The theoretical part was focused on theoretical calculations of the impact of solid-phase content on inhomogeneity during primary drying of lyophilization using LyoCalculator and an explanation of experimental observations and comparison with the theoretical simulation.

Lyophilizer used in experimental studies

Edwards lyophilizer – The Edward lyophilizer is a high-performance lyophilizer that consists of a drying chamber, a condenser, and a vacuum pump. There are three shelves with diameters of 300 x 500 mm in the chamber. This type of lyophilization equipment uses a stainless steel product frame, on which it will fit of 136 vials, so that a total of 408 vials of product can be lyophilized at one time. The Edwards lyophilizer has adjustable and controlled shelf temperature in the range from - 40 °C to + 55 °C, while the pressure is not controlled only monitored and during drying is typically in the range from 0.1 Torr to 0.8 Torr. One of the biggest advantages of the Edwards lyophilizer is that the vials filled with the solution do not have to be frozen in a freezer before being placed in the lyophilizer, but freezing is part of the cycle inside the dryer.

Sublimation studies

In sublimation tests, the drying rate in individual vials is determined experimentally at different locations in the lyophilizer. The drying rate is evaluated gravimetrically, by weighing the weight loss of the sublimed water in the individual vials.

Experimental studies of inhomogeneous lyophilization, focused on sublimation tests, were performed with different concentrations of sucrose solution. Subsequently, inhomogeneity was evaluated using the inhomogeneity ratio.



Figure 6 Edwards lyophilizer.

Inhomogeneity ratio

One of the good indicators of inhomogeneity of the freeze-drying process is the mass of sublimed water. To calculate the inhomogeneity of the batches, equation (1) is used, which is defined as the ratio of the maximum and minimum amount of the water sublimed from vials:

$$R = \frac{\Delta m_{max}}{\Delta m_{min}} \quad (1)$$

Where,

R – inhomogeneity ratio [-]

Δm_{max} – maximum amount of sublimed water [g]

Δm_{min} – minimum amount of sublimed water [g]

Equation (1) shows that as the result approaches 1, the batch becomes more homogeneous, so the greater R , the larger the difference between the maximum and minimum amount of sublimed water, and the batch becomes less homogeneous (Matejčíková and Rajniak, 2020).

Theoretical calculations of inhomogeneous lyophilization using LyoModelling Calculator

A simple "LyoModelling Calculator" model for practical and theoretical calculations is available on the Internet: <https://www.spscientific.com/LyoCalc/Lyocalculator.html>. LyoModelling Calculator is based on the steady-state model of the heat and mass transfer during primary drying.

In the experimental part, we worked with different concentrations of sucrose solution. Empirical parameters for the lyophilized cake resistance of the 5 % solution of sucrose at different nucleation temperatures were found in the Material database of the LyoCalculator. As a testing example, we performed calculations with the LyoCalculator for both limiting heat transfer coefficients, i.e. for the central and corner vials. The results indicate, that the presence of the dissolved solid in the formulation and subsequent formation of a porous cake during drying will decrease the differences between the drying rates in corners versus centre.

To understand better the interplay between heat and mass transfer and their impact on the inhomogeneity ratio, we performed more detailed theoretical simulations using the LyoCalculator. In these simulations, we compared the inhomogeneity ratio R for two heat transfer coefficients and for increasing resistance of the porous cake R_p . The results are summarized graphically in **Figure 2** and show that increasing cake resistance, which increases with the solids-phase concentration, decreases inhomogeneity. In this case, as the concentration of the solution increases, it is more controlled by mass transfer and less dependent on the differences in the heat transfer coefficient. This phenomenon was also investigated experimentally.

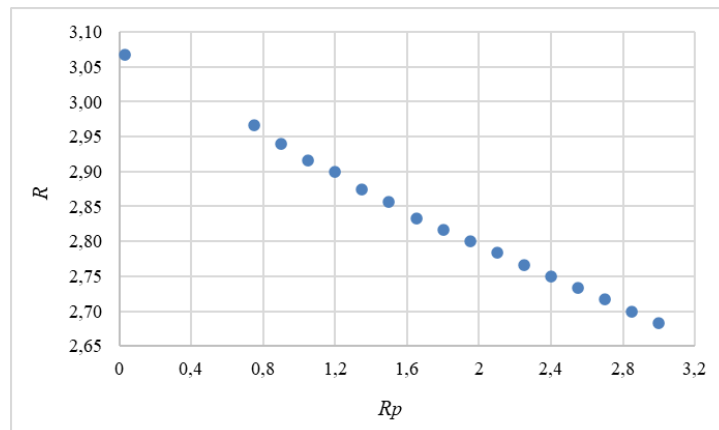


Figure 7 Graphical dependence of theoretical calculations of the effect of cake resistance on the inhomogeneity ratio.

Evaluation of sublimation tests

Study of the impact of solid-phase resistance

Experimentally we performed four experiments, in which we compared the effect of different concentrations of the sucrose solution on the resistance of the cake and subsequently on the inhomogeneity ratio.

Before starting the process and placing the vials in the lyophilizer, the empty glass vials were weighed (m_0) without a rubber stopper and then filled with 5 ml of concentrated sucrose solution and weighed individually without the rubber stopper (m_1). After placing the vials on the heating shelf, a lyophilization cycle was started. At the end of the process, the vials were placed back on the aluminium tray and weighed again without a rubber stopper (m_2). The difference between m_1 and m_2 corresponds to the amount of sublimed water from the sample (Δm).

Figure 3 depicted the drying rates in colour in four different concentrated solutions of sucrose. The colour representation is evaluated according to the colour scale, **Table 1**, where each colour represents the range of the amount of sublimed water - the highest amount of sublimed water is the burgundy colour and, conversely, the lowest amount of sublimed water is the dark green colour.

After evaluating the amount of sublimed water in the individual vials, the maximum and minimum amount of sublimed water from one batch (normalized to Δm_{max}) were selected and the inhomogeneity ratio was calculated using equation (1). The resulting values of the mass of sublimated water, as well as the inhomogeneity ratio for all experiments, are summarized in **Table 2**.

Table 1 Colour representation of drying rate for Figure 1.

<i>Mass sublimed [g]</i>	
1	0.600 – 0.650
2	0.651 – 0.700
3	0.701 – 0.750
4	0.751 – 0.800
5	0.801 – 0.850
6	0.851 – 0.900
7	0.901 – 0.950
8	0.951 – 1.000

Table 2 Comparison of maximal and minimal amount sublimed of water and inhomogeneity ratio at different concentration solution of sucrose.

	Δm_{max} [g]	Δm_{min} [g]	<i>Inhomogeneity ratio</i>
A) 10 % solution of sucrose	1	0.8618	1.16
B) 7.5 % solution of sucrose	1	0.7212	1.39
C) 5 % solution of sucrose	1	0.6621	1.51
D) 2.5 % solution of sucrose	1	0.6405	1.56

In contrast to the experiments with distilled water, which were controlled only by heat transfer, in this case, a cake was formed which generated resistance during the primary drying. The greater the resistance of the cake, the more the process was controlled also by mass transfer.

In terms of lyophilization inhomogeneity, we have confirmed that the more concentrated the solution, the lower the inhomogeneity ratio. At the lowest concentration (2.5 %) of the sucrose solution, we obtained the inhomogeneity ratio of 1.56, while at the highest concentration (10 %) of the sucrose solution the inhomogeneity ratio decreased to 1.16.

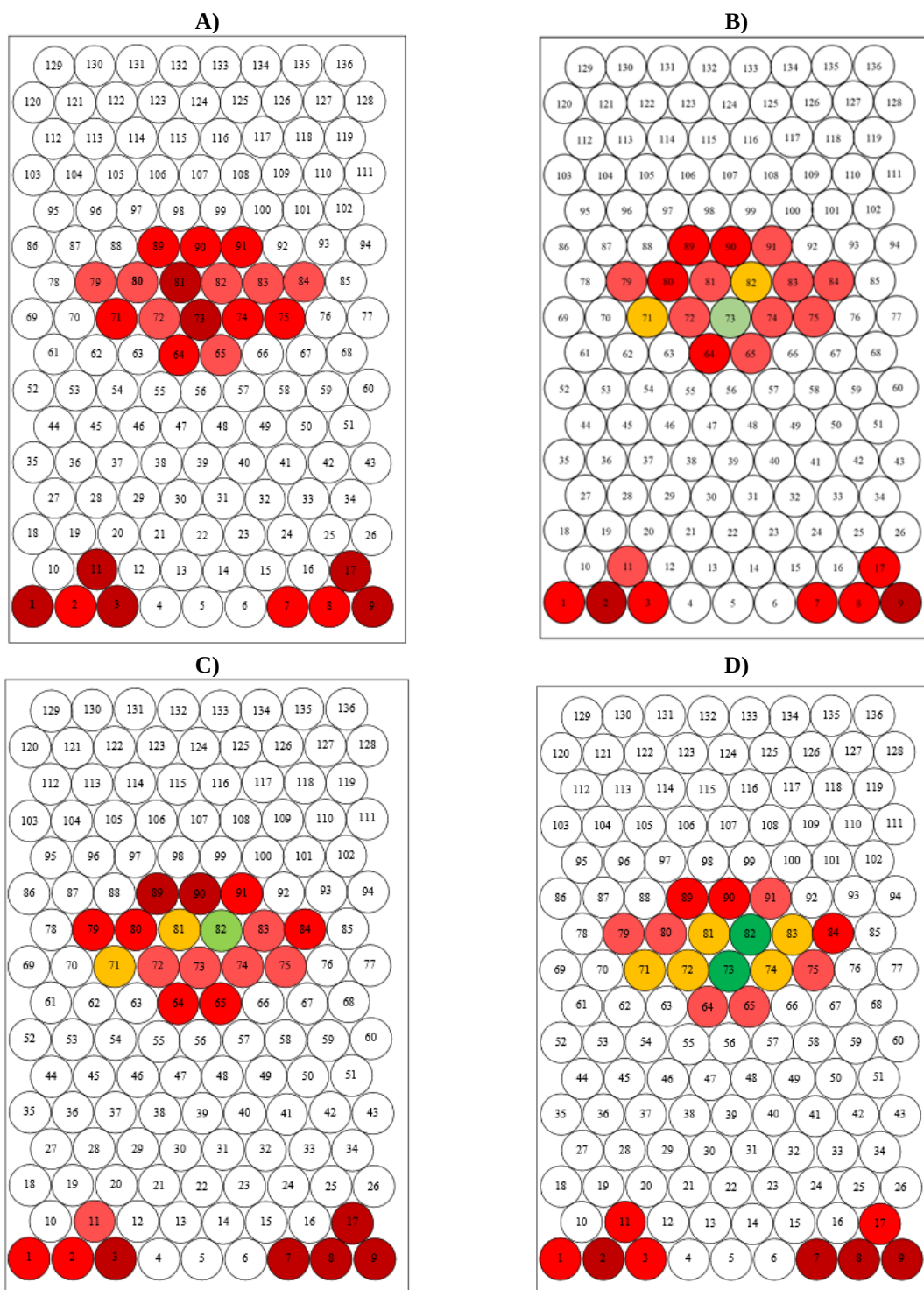


Figure 3 The colour representation of drying rate of the frozen solutions of sucrose with different concentration. Figure A) shows 10 % solution of sucrose, B) depicted 7.5 % solution of sucrose, C) represents 5 % solution of sucrose and D) shows 2.5 % solution of sucrose.

Lyophilization of natural entities

In the second experimental part, in addition to sublimation tests, we also designed optimal conditions for drying and stabilization of selected natural entities such as extract of rhubarb root (**Figure 4**) and extract of white willow bark (**Figure 5**). The figures show the extracts of both natural entities after the freeze-drying process, stored in the refrigerator. Comparison of chemical analyses (LC-MS, IR) for the rhubarb root shows the equivalent chemical composition of both, the original extract solution, tested in October 2021, and the reconstituted solution of the lyophilized product, tested in April 2022. Subsequently, these lyophilizates will be continuously examined also for other activities (antiviral, antibacterial, and anti-inflammatory) after certain periods of time.



Figure 4 Extract of rhubarb root after the lyophilization.



Figure 5 Extract of white willow bark after the lyophilization.

Acknowledgment

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Development of products by modification of natural substances and study of their multimodal effects on COVID-19, ITMS: 313011ATT2, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

1. Matejčíková, A. and Rajniak, P. (2020) 'Impact of packing density on primary drying rate', *Acta Chimica Slovaca*, 13(2), pp. 1–8. Available at: doi.org/10.2478/acs-2020-0021.

Research of inhomogeneous lyophilization and development of methods for the stabilization of samples

Krošláková S¹., Pakanová Z³., Rajniak P^{1,2}., Mucha J³

¹ Sitno Pharma, Ltd., Rybné námestie 4135/1, 811 02 Bratislava

² Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 2101/9, 812 37 Bratislava

³Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 5807/9, 845 38 Bratislava

Lyophilization is a multi-step process and is one of the most energy-disadvantageous and time-consuming methods. Nevertheless, various pharmaceutical companies use freeze-drying to extend the shelf life of products, such as injectables or vaccines. In addition, lyophilization is now becoming increasingly important due to the rapid development of biotechnology and the associated production of modern drugs such as therapeutic proteins or monoclonal antibodies. The freeze-drying cycle consists of freezing the substance and then removing the solvent (water) by sublimation, which passes directly from the solid to the gas phase. There are several possible reasons that affect the drying rate in the vials, such as the heat transfer through the walls of the lyophilizer, the different design of the heating shelves in the lyophilization equipment, and finally, the packing density of the vials.

The aim of the work was an experimental study of inhomogeneous lyophilization in lyophilizers of various sizes and the construction and development of methods of using lyophilization for the stabilization of samples from human biological fluids, as well as to compare the suitability of using different vials and Eppendorf tubes for drying and stabilizing samples. The experimental part was performed at the Institute of Chemistry of the Slovak Academy of Sciences (ChÚ SAV).

Lyophilizers used in experimental studies

Christ lyophilizer – The Christ Alpha 1-2 LDplus lyophilizer is a compact and high-performance model for efficient lyophilization. The weight of the lyophilizer is approx. 28 kg and consists of two unheated teflon-coated stainless steel shelves with a diameter of 200 mm. The capacity of the ice condenser is 2.5 kg, and the condenser temperature is approx. -55 °C, which allows drying of aqueous solutions. The diameter of the acrylic drying chamber is 240 mm with a weight of 3.6 kg. The pressure in the lyophilizer during drying is around 0.063 - 0.075 mBar.

Labconco lyophilizer – The Labconco lyophilizer is designed for drying smaller as well as larger amounts of aqueous solutions. This type of lyophilization equipment is very easy to operate. Compared to the Christ lyophilizer, it is much larger. It consists of a drying chamber, a vacuum pump and a cooling coil made of stainless steel. The LCD displays system operating parameters, setting parameters and alarm messages. The condenser temperature is approx. -48 °C, which allows the drying of aqueous solutions. The diameter of the drying chamber is approximately 270 mm, on which the vent valve is located. The typical pressure in the lyophilizer during drying is about 0.027 mBar.

Sublimation studies

We evaluated the experimental testing of the drying speed using gravimetric sublimation tests in different lyophilizers, by weighing the weight loss of the sublimed water in the individual vials. In sublimation tests, the drying rate in individual vials is determined experimentally at different locations in the lyophilizer. Subsequently, inhomogeneity was evaluated using the inhomogeneity ratio. The calculated inhomogeneity of the batches is defined as the ratio of the maximum and minimum amount of water sublimed from vials.

We performed several experiments with different types of vials, also comparing different protections (outflow barriers) such as parafilm with different numbers of holes, filter paper, and gauze.



Figure 8 Christ lyophilizer.



Figure 2 Labconco lyophilizer.

Evaluation of sublimation tests

Different types of vials or Eppendorf tubes and different uses of their protection were compared for example parafilm, filter paper, and gauze.

Before placing the vials/Eppendorf tubes in the lyophilization equipment, the vials were filled with deionized water, 3.5 % whole milk, or 3 % solution of salt and weighed without stopper and protection (m_1). Then, if necessary, they were covered with the used protection and placed in a freezer at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. After the sample solidified, the vials or Eppendorf tubes were then placed in a lyophilizer. At the end of the process, all vials were weighed again without stopper and protection (m_2). In the last step, the amount of sublimed water (Δm) was calculated as a difference of values m_1 and m_2 .

Figure 3 shows colour drying rates in all comparative experiments. The colour representation is evaluated according to the colour scale, **Table 1**, where each colour represents the range of the amount of sublimed water - the highest amount of sublimed water is burgundy and, conversely, the lowest amount of sublimed water is dark green.

Table 3 Colour representation of drying rate for Figure 3.

	<i>Mass sublimed [g]</i>
1	0.881 – 1.001
2	1.002 – 1.121
3	1.122 – 1.241
4	1.242 – 1.361
5	1.362 – 1.481
6	1.482 – 1.601
7	1.602 – 1.721
8	1.722 – 1.841
9	1.842 – 1.961
10	1.962 – 2.081

The resulting amounts of sublimed water, as well as the inhomogeneity ratio for all experiments, are summarized in **Table 2** and **Table 3**, where ↑ shows the placement of the rack with tubes on the top shelf and ↓ shows the placement of the rack with tubes on the bottom shelf.

Table 4 Comparison of maximal and minimal amount sublimed of water and inhomogeneity ratio for experiments A) - F).

<i>Experiment</i>	Δm_{max} [g]	Δm_{min} [g]	<i>Inhomogeneity ratio</i>
A) ↑	1.9822	1.9277	1.03
↓	1.9151	1.8022	1.06
B) ↑	1.9838	1.7908	1.11
↓	0.9906	0.8812	1.12
C) ↑	1.2960	1.1849	1.09
↓	1.2220	1.1282	1.08
D) ↑	1.2563	1.0087	1.25
↓	1.2183	0.9665	1.26
E) ↑	1.4967	1.2782	1.17
↓	1.3956	1.2346	1.13
F) ↑	1.3367	1.1326	1.18
↓	1.4705	1.2357	1.19

First, we performed several experiments comparing the drying rate in glass vials and plastic vials with different protection applications **Figure 3**. The highest amount of sublimed water was from glass vials and plastic vials without stopper and protection. In experiments, where we used a rubber band to fasten the vials so that all vials remained in their original arrangement during lyophilization, the results confirmed that the drying rate is slowest in the central vials, which are surrounded by another six vials. All results are shown in the **Table 2**.

Table 5 Comparison of maximal and minimal amount sublimed of water and inhomogeneity ratio for experiments G) - J).

<i>Experiment</i>	Δm_{max} [g]	Δm_{min} [g]	<i>Inhomogeneity ratio</i>
G) deionized water ↑	0.4359	0.2364	1.84
↓	0.3602	0.1970	1.83
H) deionized water ↑	0.7190	0.3389	2.12
↓	0.6528	0.3878	1.68
I) 3.5 % whole milk ↑	0.9067	0.8961	1.01
↓	0.9152	0.9011	1.02
J) 3 % solution of salt ↑	1.0017	0.9662	1.04
↓	0.9912	0.9558	1.04

In other sublimation tests, unlike glass and plastic vials, we used polypropylene Eppendorf tubes. In these experiments, the drying rate in the used Eppendorf tubes with a parafilm with different numbers of holes or without a parafilm was also compared. In the first two experiments, we worked with deionized water, where the results of experiments showed high inhomogeneity even when using Eppendorf tubes, with factors from 1.68 - 2.12. In the last two experiments, our goal was to monitor whether solid-phase escape

occurred during the lyophilization process. The results showed that with a 3 % solution of salt it is necessary to use protection (most often parafilm is used) against solid-phase escape. This is due to the fact that the 3% solution of salt formed much finer and lighter particles that could not be retained at the bottom of the Eppendorf tubes. All results are summarized in the **Table 3**.

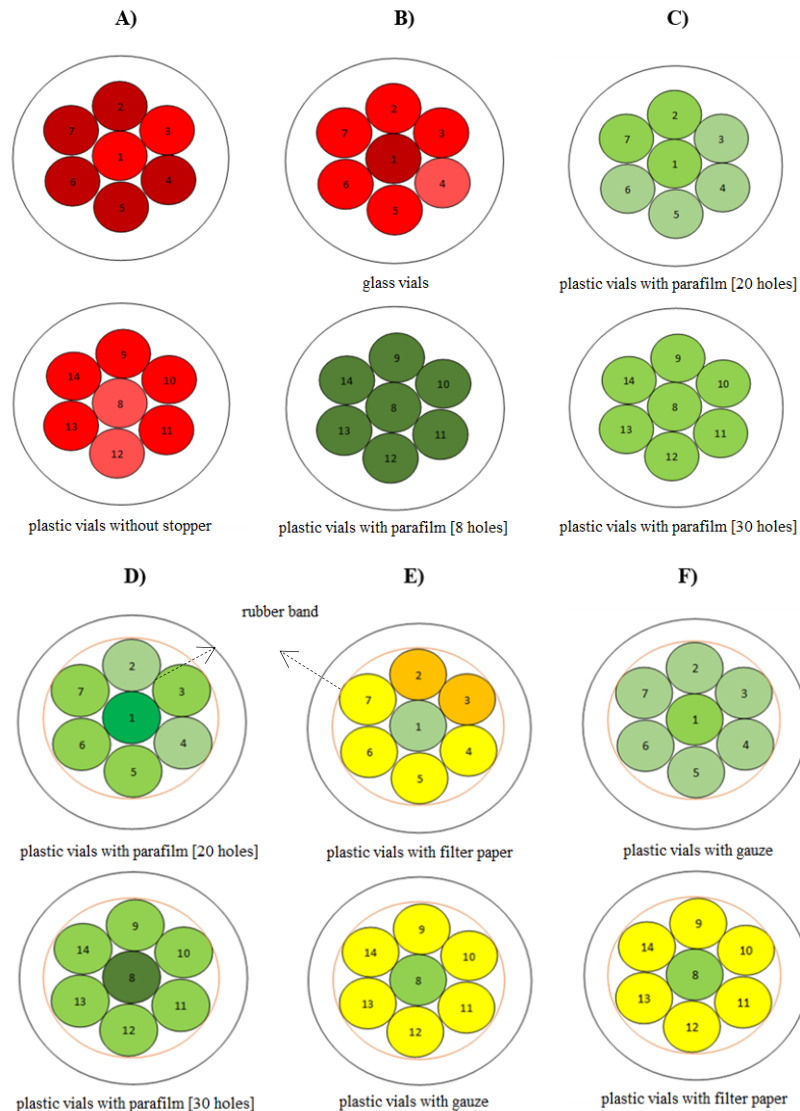


Figure 3 Colour representation of drying rate in vials with different types of their protection.

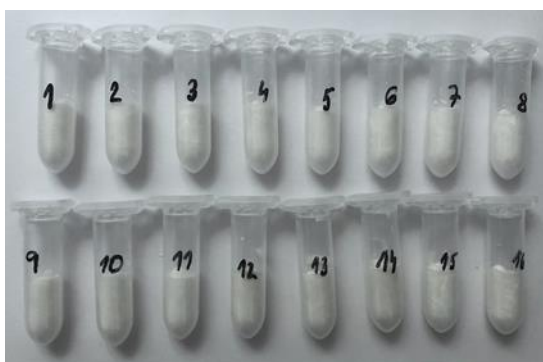


Figure 4 Final products from the experiment with 3.5 % whole milk.



Figure 5 Final products from the experiment with 3 % solution of salt.

To eliminate the problem (solid-phase escape), we found and purchased commercially available vials with sterile-venting membrane screw caps. These vials are special in that they contain permeable membranes, thus being able to prevent contamination and solid-phase escape while allowing the product to dry. The aim was to compare the drying rate in standard glass and plastic vials, **Figure 6** and glass vials with/without membrane screw caps, **Figure 7**.



Figure 6 Standard plastic and glass vials.



Figure 7 Vials with sterile-venting membrane screw caps.

Table 6 Comparison of the drying rate in three different types of vials.

<i>Type of vials</i>	Δm [g]
	2.4393
Glass vials with rubber stoppers	2.2108
	1.7496
Glass vials with membrane screw caps	1.8776
	3.2511
Glass vials without membrane screw caps	3.2053
	2.0914
Plastic vials	2.1117

The results, **Table 4** showed that the drying rate is 1.28-fold slower in glass vials with membrane screw caps compared to glass vials with a rubber stopper and 1.16-fold slower than in plastic vials. It follows that if we did not want to risk solid-phase escape during freeze-drying and we would like to use this type of vials, the drying time would have to be extended, which is associated with higher investment and operating costs for the lyophilization process.

Lyophilization of biological material

Finally, we proposed optimal conditions for the drying and stabilization of human serum for analysis of N-glycoprofile. Reference serum samples (obtained from Sigma-Aldrich, MA, USA) were stored for the period of 10 days at room temperature with and without lyophilization and then the N-glycoprofile of serum proteins was analyzed as described before (Ziburová et al., 2021). Samples of lyophilized human serum are shown in **Figure 8**.

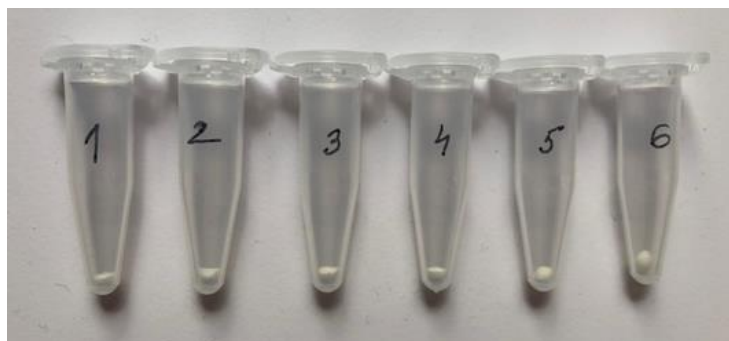


Figure 8 Human serum after the lyophilization.

Analysis of serum N-glycoprofile by mass spectrometry revealed significant effect of lyophilization on obtained relative intensities of single glycan structures. Relative intensity of the most abundant disialo diantennary N-glycan in human (m/z 2792) was maintained in lyophilized sample, even when stored at room temperature, and its level was similar to the one in sample stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (data not shown). These results suggest lyophilization as a suitable option for storage of biological samples, when deep freezing equipment is not available.

Acknowledgment

This publication was created with the support of the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: Study of structural changes of complex glycoconjugates in the process of inherited metabolic and civilization diseases, ITMS: 313021Y920, co-financed by the European Regional Development Fund. This work was supported by Ministry of Health of the Slovak Republic under the project registration number 2019/7-CHÚSAV-4.

References

1. Ziburová J., et al. (2021) 'A novel homozygous mutation in the human ALG12 gene results in an aberrant profile of oligomannose N-glycans in patient's serum', American Journal of Medical Genetics Part A, 185A: 3494– 3501. Available at: doi.org/10.1002/ajmg.a.62474.