На правах рукописи



Басов Никита Вячеславович

Разработка и применение подхода к целевому метаболомному анализу методом ВЭЖХ-МС/МС на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола

1.5.4 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Новосибирск 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет».

Научный руководитель:

Рогачев Артем Дмитриевич, к.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, с.н.с.; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, зав. лаб.

Официальные оппоненты:

Дмитренок Павел Сергеевич, д.х.н., чл.-кор. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, директор.

Черноносов Александр Анатольевич, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН, г. Новосибирск, в.н.с.

Центалович Юрий Павлович, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» СО РАН, г. Новосибирск, г.н.с.

Защита диссертации состоится 2 октября 2026 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « 26 » августа 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., Пестряков П. Е.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Метаболомика – новое и активно развивающееся направление в биоаналитической химии, цель которого заключается в количественной оценке совокупности малых молекул (молекулярной массой менее 1,5 кДа), присутствующих в биологической системе в любом ее физиологическом состоянии (Griffiths W.J., 2010). Метаболом наиболее близко отражает фенотип, интегрируя результаты регуляторных и ферментативных процессов, что определяет его значимость для фундаментальной биохимии, биомедицины, фармакологии и поиска диагностических и прогностических биомаркеров.

Ключевым инструментом метаболомных исследований является ВЭЖХ-МС/МС, обеспечивающая высокую чувствительность и селективность. Однако выраженная химическая неоднородность метаболитов (различия по полярности, структуре и кислотно-основным свойствам) требует применения комплементарных хроматографических режимов — обращённо-фазовой хроматографии (ОФХ) и хроматографии гидрофильных взаимодействий (ГФХ, HILIC). Их использование, как правило, связано со сменой колонок или усложнением аналитических схем, что увеличивает трудоёмкость и снижает воспроизводимость. В связи с этим актуальной задачей является разработка подходов, обеспечивающих комбинированную селективность в рамках единой хроматографической системы. Перспективным решением является применение функционализированных монолитных сорбентов, позволяющих реализовать как ОФХ-, так и ГФХ-механизмы удерживания без смены условий анализа. Дополнительную сложность представляет разнообразие биологических образцов (плазма, ткани, опухолевые образцы), что требует универсальных и воспроизводимых аналитических решений. Таким образом, разработка комбинированного хроматографического подхода для целевого метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС является актуальной научной задачей, направленной на расширение метаболомного охвата и повышение сопоставимости данных.

В связи с этим **целью** настоящей работы являлась разработка и экспериментальное обоснование нового подхода к целевому скринингу широкого спектра метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки с сорбентом, полученным путем сополимеризации стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола, и взаимодополняющих режимов гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии, а также применение разработанного подхода для анализа метаболитов в биологических образцах различного происхождения.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать хроматографическое поведение ряда эндогенных метаболитов различной полярности в условиях гидрофильной хроматографии (ГФХ) и обращенно-фазовой (ОФХ) на монолитной колонке на основе сополимера стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола и подвижной фазы, состоящей из буферного раствора карбоната аммония (pH = 9,8) и ацетонитрила.
2. Разработать экспрессный подход к целевому скринингу широкого спектра метаболитов, заключающийся в анализе образца в режимах ГФХ и ОФХ и тандемной масс-спектрометрии. Сравнить метаболомное покрытие разработанного подхода с покрытием, достигающимся с использованием коммерчески доступных колонок и соответствующих им условиям хроматографирования.
3. С применением разработанного подхода провести анализ методом ВЭЖХ-МС/МС биологических образцов различной природы, включая плазму крови, сухие пятна крови и образцы биологических тканей и клеточных линий.
4. С использованием разработанного аналитического подхода выявить метаболомные различия биологических систем на примере животных, подвергшихся ионизирующему излучению; пациентов с послеоперационным делирием; образцов первичной глиобластомы и перитуморальной ткани.

5. Разработать и оптимизировать протокол пробоподготовки адгезивных клеточных культур для целевого метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС и апробировать его при исследовании метаболомных эффектов терагерцового излучения на клеточном уровне.

Научная новизна исследования. В настоящей работе впервые экспериментально обоснована возможность использования монолитной хроматографической колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола для целевого метаболомного анализа в режимах как гидрофильной, так и обращенно-фазовой хроматографии в рамках одной аналитической платформы ВЭЖХ-МС/МС. Показано, что данный тип сорбента обеспечивает воспроизводимое удерживание и разделение метаболитов различной химической природы, включая полярные низкомолекулярные соединения и липидные молекулы.

Впервые предложен и реализован комбинированный подход к метаболомному скринингу, основанный на последовательном анализе одной и той же пробы в режимах ГФХ и ОФХ на одной монолитной колонке с использованием одной пары элюентов. Такой подход позволил расширить охват детектируемых метаболитов без применения многомерной хроматографии и без увеличения общей сложности аналитической схемы. Впервые проведено экспериментальное сравнение метаболомного покрытия, достигаемого при использовании монолитной колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола, с результатами, полученными на коммерчески доступных колонках с сорбентами различной природы (октадецильной, пентафторфенильной, аминопропильной). Показано, что разработанный подход обеспечивает более широкий охват метаболитов при анализе плазмы крови человека по сравнению с традиционно применяемыми колонками.

Впервые с использованием единого целевого ВЭЖХ-МС/МС-подхода в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии выявлены изменения липидного профиля плазмы крови у пациентов с послеоперационным делирием, а также метаболические различия между тканью глиобластомы и перитуморальным пространством, что демонстрирует универсальность разработанного аналитического решения и его применимость для исследований различной биомедицинской направленности. Впервые показана применимость разработанного метода для анализа сухих пятен крови в задачах радиационной биологии, что позволило выявить метаболические маркеры и нарушенные метаболические пути в крови мышей после рентгеновского облучения, а также проследить их временную динамику.

Теоретическая значимость исследования. Результаты работы расширяют методологические представления о роли хроматографического разделения в метаболомике, показывая, что выбор сорбента со смешанным механизмом удерживания позволяет рассматривать гидрофильную и обращенно-фазовую хроматографию как взаимно дополняющие аналитические режимы в рамках единого подхода. Работа вносит вклад в развитие концепции целевого метаболомного скрининга, демонстрируя возможность оптимального баланса между широтой охвата метаболитов, воспроизводимостью анализа и аналитической чувствительностью при масс-спектрометрической детекции.

Научно-практическая значимость исследования. Разработанный подход может быть использован в научных и прикладных метаболомных исследованиях для анализа различных биологических образцов, включая плазму крови, сухие пятна крови и тканевые образцы, без необходимости применения нескольких хроматографических колонок и сложных двумерных систем. Методика применима для работы с клиническим материалом, что подтверждено при анализе плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием, а также тканей глиобластомы, и может быть использована при поиске метаболических и липидных маркеров патологических состояний. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших мультиомных исследований, включая интеграцию метаболомных данных с транскриптомным и протеомным анализом, а также для разработки прикладных диагностических и прогностических подходов в биомедицинских исследованиях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Подход к целевому метаболомному анализу биологических образцов методом ВЭЖХ-МС/МС, основанный на использовании монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и комбинации последовательных анализов образца в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии с использованием одного и того же набора элюентов, обеспечивает скрининг как полярных метаболитов, так и липидных молекул за один анализ длительностью менее 30 минут.
2. Разработанный подход позволяет проводить целевой скрининг большего числа метаболитов (полярных и липидных молекул) за один анализ по сравнению с коммерчески доступными хроматографическими колонками (с октадецильной, пентафторфенилпропильной и аминопропильной фазами).
3. Разработанный подход позволяет выявлять изменения содержания метаболитов и работы метаболических путей, отражающие характер системного метаболического ответа на ионизирующее излучение при анализе сухих пятен крови мышей до и после облучения рентгеном.
4. Метаболомный анализ с использованием разработанного подхода позволяет выявить статистически значимые изменения содержания сфингомиелинов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием, что указывает на вовлечение нарушений сфинголипидного обмена в патогенез данного осложнения.
5. Метаболомный анализ тканей глиобластомы и перитуморального пространства с применением разработанного подхода способен выявлять различия в липидном и энергетическом обмене, включая изменения содержания пуриновых метаболитов и церамидов.
6. Применение разработанного и оптимизированного протокола пробоподготовки адгезивных клеточных культур в сочетании с предложенным подходом целевого метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС обеспечивает воспроизводимое извлечение метаболитов различной полярности, демонстрирует зависимость аналитического сигнала и охвата метаболома от клеточной биомассы и позволяет выявлять метаболические перестройки клеток при воздействии физических факторов на примере терагерцового излучения.

Методология и методы исследования. Работа основана на междисциплинарном подходе, объединяющем методы аналитической химии, биохимии, клеточной биологии и биоинформатики, и выполнена в рамках метаболомики как направления, ориентированного на анализ и интерпретацию низкомолекулярных метаболитов. Ключевым методом являлась высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС). Разделение проводили на монолитных колонках на основе 1-винил-1,2,4-триазола с дуальным механизмом удерживания, что позволило реализовать последовательный анализ одной пробы в режимах ГФХ и ОФХ для расширения метаболомного охвата. Детектирование осуществляли в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) на тройном квадруполе с ионизацией электрораспылением.

Пробоподготовку адаптировали к типу биологического образца: для плазмы и сухих пятен крови применяли осаждение белков, для клеточных культур — разработанный протокол с подсчётом клеток, промывкой, лизисом и экстракцией с внутренними стандартами. Проанализированы плазма крови человека, сухие пятна крови лабораторных животных, ткани глиобластомы и клеточные культуры; эксперименты проведены с соблюдением этических норм. Обработка данных включала методы исследовательского анализа и статистики (t-тест, критерии Манна–Уитни и Куккони, коррекция данных методом Бенджамини–Хохберга), а также применение веб-интерфейса MetaboAnalyst и базы данных KEGG.

Степень достоверности. Достоверность представленных в работе результатов обусловлена однородностью выборки объектов исследования, достаточным количеством повторных измерений для одного объекта исследования, биохимической согласованностью

полученных результатов с ранее опубликованными результатами, а также теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

Личный вклад автора. Автором разработаны условия хроматографического разделения в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и колонках сравнения. Автор лично провел оптимизацию параметров анализа методом ВЭЖХ-МС/МС, включая выбор элюентов, градиентов элюирования и условий масс-спектрометрической детекции. Автором выполнен основной объем экспериментальных исследований, включая анализ метаболитов плазмы крови человека, сухих пятен крови мышей после рентгеновского облучения, плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием и образцов ткани глиобластомы и перитуморального пространства. Автор принимал непосредственное участие в отборе образцов от животных, работе с клиническими данными, пробоподготовке образцов, проведении ВЭЖХ-МС/МС анализа и контроле качества аналитических данных.

Автором самостоятельно выполнены обработка и интерпретация экспериментальных данных, включая анализ хроматографического поведения метаболитов, сравнение метаболомного покрытия, исследовательский и статистический анализ данных, а также интерпретацию выявленных метаболических сигнатур. Анализ метаболических путей выполнен автором с использованием специализированных программных средств. Автором проведен анализ и обобщение полученных результатов, сопоставление их с литературными данными, формулировка выводов и положений, выносимых на защиту. Автором подготовлен текст диссертации. Основная роль в подготовке иллюстративного материала и формировании структуры работы также принадлежит автору. Автором диссертационной работы внесен существенный вклад в подготовку научных публикаций по теме исследования.

Связь диссертации с основными научными темами, внедрение результатов. В диссертацию включены результаты, полученные соискателем при выполнении исследований по гранту РНФ № 22-23-01068 "Синтез новых органических монолитных сорбентов для целевого скрининга метаболитов сыворотки крови методом ВЭЖХ-МС/МС и поиска биомаркеров постоперационного делирия" под руководством к.х.н. А. Д. Рогачева и государственного задания FSUS-2025-0012 под руководством чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. А. Г. Покровского.

Публикации и апробация результатов исследования. По материалам диссертации опубликованы 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, а также тезисы 12 докладов. Результаты исследования докладывались на конференциях в виде 5 устных докладов. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: Международная научная студенческая конференция (Новосибирск, 2019); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2022); Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2022); Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2023); International Symposium ‘Medicinal Chemistry and Biomedical Materials Science’ (Самарканд, 2025).

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка, 11 таблиц и 2 приложения. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Библиографический список состоит из 230 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка метода анализа метаболитов с использованием комбинации разделения ГФХ и ОФХ на органической монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и масс-спектрометрического детектирования

1.1 Исследование хроматографического поведения эндогенных метаболитов на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола

При сополимеризации стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола с последующей термообработкой формируется полимерный монолит, ковалентно связанный с поверхностью стеклянной трубки и представляющий собой трехмерную пористую структуру. Введение триазольного мономера обеспечивает полярные свойства сорбента. Такие монолитные системы способны функционировать как в режиме гидрофильной (ГФХ), так и обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ), что делает их перспективными для метаболомного анализа. Ключевым фактором при разработке ВЭЖХ-МС/МС методик является выбор подвижной фазы, ограниченный требованиями летучести. Использование карбоната аммония (20 мМ, pH = 9,8) повышает эффективность ионизации полярных метаболитов, улучшает стабильность сигнала и снижает матричные эффекты. Однако такие условия требуют химически устойчивых стационарных фаз, что обосновывает применение полимерных монолитных колонок. Для оценки хроматографического поведения были исследованы классы метаболитов, охватывающие широкий диапазон полярности: аминокислоты, ацилкарнитины, церамиды, фосфатидилхолины и фосфатидилинозитолы.

Анализ плазмы крови показал, что их поведение определяется химическим строением и режимом хроматографии. Аминокислоты эффективно удерживаются в режиме ГФХ и элюируются в мертвом объеме в ОФХ, что указывает на преобладание гидрофильных взаимодействий. Церамиды, напротив, удерживаются в режиме ОФХ и элюируются при высокой доле органического растворителя; их детектируемость зависит от структуры заместителей. Ацилкарнитины демонстрируют переходный характер: короткоцепочечные не удерживаются в ОФХ, тогда как длинноцепочечные (C_{10}–C_{18}) удерживаются; при этом все соединения данного класса детектируются в ГФХ. Фосфатидилхолины удерживаются в ОФХ и не удерживаются в ГФХ, тогда как фосфатидилинозитолы проявляются преимущественно в режиме ГФХ.

Анализ нормированных времен удерживания позволил выделить группы метаболитов с различным типом взаимодействия с сорбентом. Таким образом, показано, что монолитная колонка на основе сополимера стирола, дивинилбензола и винилтриазола обеспечивает селективное удерживание соединений различной природы и позволяет реализовать взаимодополняющие режимы ГФХ и ОФХ. Переключение режимов сопровождается инверсией порядка элюирования классов метаболитов, что расширяет охват метаболома в рамках одной аналитической платформы.

1.2 Комбинация режимов ВЭЖХ с дуальным механизмом разделения

На предыдущем этапе работы была продемонстрирована возможность использования монолитной колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола (VTr) для метаболомного скрининга как в режиме гидрофильной (ГФХ), так и обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ). В связи с этим в дальнейшем был проведен анализ расширенного набора метаболитов, охватывающего основные метаболические пути. На основе литературных данных (Li K., 2017; Yuan M., 2012) был сформирован список MRM-переходов, пригодных для скринингового анализа на тройном квадруполе. После объединения, удаления дублирующих переходов и исключения внутренних стандартов был получен перечень из 726 MRM-переходов. Для оптимизации времени цикла сканирования данный список был разделен на две сопоставимые группы, каждая из которых включала соединения, детектируемые в положительном и отрицательном режимах ионизации.

Обе группы анализировали на объединенных (пулированных) образцах плазмы крови человека, подготовленных по протоколу (Li K., 2017), с использованием монолитной колонки VTr в режимах ГФХ и ОФХ. В качестве подвижной фазы использовали систему на основе 20 мМ карбоната аммония (pH 9,8) и ацетонитрила, при различии только в градиентах элюирования. Полученные хроматограммы обрабатывались вручную с учетом времени удерживания и площади пика. Приоритет отдавался режиму, в котором метаболит удерживался ($t_R > t_0$) или демонстрировал более интенсивный сигнал.

Табл. 1. Параметры колонок и условия хроматографирования

Колонка и ее параметры	**Элюенты и хроматографические условия**
Монолитная колонка на основе 1-винил-1,2,4-триазола (VTr), 2 × 60 мм.	Элюент А: 5% ACN в водном растворе 20 мМ $(NH_4)_2CO_3$, доведенный до pH = 9,8 водным раствором аммиака. Элюент Б: 100% ACN. Градиент ГФХ: 0 мин - 98% Б, 2 мин - 98% Б, 6 мин - 0% Б, 10 мин - 0% Б. Далее колонка уравновешивалась на протяжении 4 минут. Градиент ОФХ: 0 мин - 0% Б, 1 мин - 0% Б, 6 мин - 98% Б, 16 мин - 98% Б. Далее колонка уравновешивалась на протяжении 3 минут. Скорость потока в каждом из анализов составляла 300 мкл/мин.
Phenomenex Kinetex F5, 2 × 50 мм, 5 мкм, (F5)	Элюент А: 0,1% раствор HCOOH. Элюент Б: 100% ACN. Скорость потока 200 мкл/мин. Градиент: от 0 до 2 мин - 0% Б; от 2 до 5 мин содержание Б возрастало до 95% и поддерживалось до 9 мин. Далее колонка уравновешивалась на протяжении 2,4 минут при 0% Б.
Econova Pronto-SIL 120-5 C18 AQ, 2,1 × 75 мм, 5 мкм (C18)	Элюент А: 0,1% раствор HCOOH. Элюент Б: 100% ACN. Скорость потока 200 мкл/мин. Градиент: от 0 до 2 мин - 3% Б; от 2 до 7 мин содержание Б возрастало до 10%, от 7 до 10 мин содержание Б возрастало до 90%, от 10 до 12 мин содержание Б возрастало до 100% и поддерживалось до 16,5 мин. Далее колонка уравновешивалась на протяжении 3,4 мин при 3% Б.
Econova Pronto-SIL 120-5 NH2, 2,1 × 75 мм, 5 мкм (Amino)	Элюент А: 5% ACN в водном растворе 20 мМ CH_3COONH_4, доведенный до pH = 9,0 водным раствором аммиака. Элюент Б: 100% ACN. Градиент ГФХ: 0 мин - 98% Б, 3 мин - 85% Б, 4 мин - 30% Б, 10 мин - 0% Б, 14,5 мин - 0% Б. Далее колонка уравновешивалась на протяжении 4 минут. Скорость потока 250 мкл/мин. Градиент ОФХ: 0 мин - 3% Б, 2 мин - 3% Б, 7 мин - 10% Б, 10 мин - 90% Б, от 10 до 12 мин содержание Б возрастало до 100% и поддерживалось до 16,5 мин. Далее колонка уравновешивалась на протяжении 3,4 мин. Скорость потока 200 мкл/мин.

Для оценки эффективности предложенного подхода было проведено сравнение с коммерчески доступными колонками различной селективности: пентафторфенилпропильной (F5), октадецилсилильной (C18) и аминопропильной (Amino). Выбор обусловлен их широким применением в метаболомике (табл. 1). Анализ выполняли на тех же образцах плазмы при оптимальных условиях для каждой колонки.

Показано, что использование монолитной колонки VTr обеспечивает наибольшее покрытие метаболома: всего детектировано 398 MRM-переходов (289 в режиме ГФХ и 109 в режиме ОФХ), соответствующих 390 индивидуальным соединениям. Для сравнения, на колонке Amino было обнаружено 342 метаболита, тогда как колонки F5 и C18 демонстрировали существенно более низкое покрытие (рис. 1). При этом на колонке Amino дополнительно детектировались 28 метаболитов, не выявленных при использовании VTr.

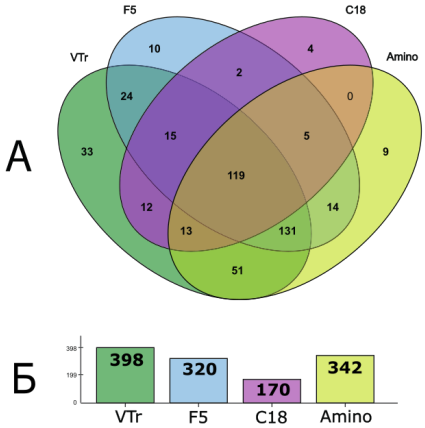


Рис. 1. Сравнение метаболомного покрытия, полученного при анализе метаболитов на хроматографических колонках в различных условиях: А) диаграмма Венна, показывающая охват метаболитов при использовании различных колонок; Б) общее количество детектируемых метаболитов при анализе на соответствующих колонках.

Повышенное покрытие при использовании монолитной колонки, вероятно, связано с применением щелочного карбонатного буфера, способствующего эффективной ионизации полярных метаболитов. Снижение эффективности колонок C18 и F5 обусловлено недостаточным удерживанием полярных соединений, элюирующихся в мертвом объеме и подвергающихся подавлению ионизации. При этом колонка F5 демонстрирует более высокую эффективность по сравнению с C18 за счет дополнительных полярных взаимодействий.

В настоящей работе предложен комбинированный подход, основанный на последовательном анализе одной и той же пробы в режимах ГФХ и ОФХ на одной колонке с использованием одной пары элюентов (рис. 2).

Анализ в режиме ГФХ обеспечивает детектирование преимущественно полярных метаболитов (289 переходов), после чего выполняется повторный ввод пробы и анализ в режиме ОФХ для выявления гидрофобных соединений (109 переходов).

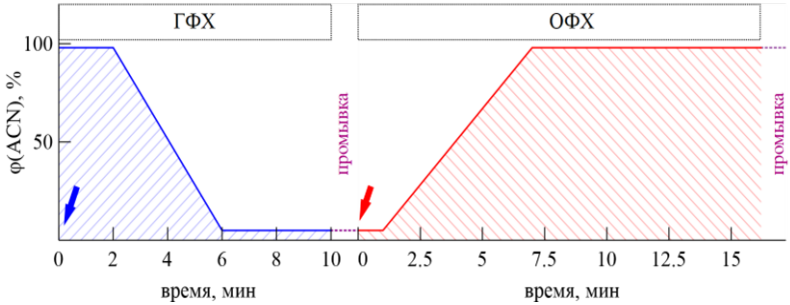


Рис. 2. Диаграмма изменения объемной доли ACN в подвижной фазе в комбинации чередующихся градиентов ГФХ и ОФХ для анализа метаболитов на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола. Градиент представляет собой комбинацию условий анализа ГФХ и ОФХ из табл. 1 за исключением этапов уравновешивания (элюент А – водный 20 мМ $(NH_4)_2CO_3$+NH_3, pH = 9,8; элюент Б – ACN). Стрелками указаны соответствующие точки введения пробы.

Общее время анализа составило 28 минут и включало два этапа промывки, необходимых для предотвращения размывания пробы и корректной смены условий. При этом предложенная схема позволяет эффективно использовать стадии промывки в качестве этапов уравновешивания колонки: завершение градиента ГФХ соответствует начальному состоянию для ОФХ, и наоборот. Это позволяет исключить дополнительные стадии уравновешивания, которые в традиционных методах могут требовать пропускания 15–20 объемов подвижной фазы.

Таким образом, предложенный подход обеспечивает расширение охвата метаболома без усложнения аппаратурной конфигурации и с сокращением времени анализа. Метод

является гибким: список MRM-переходов может быть адаптирован под конкретные задачи — как расширен, так и ограничен выбранными классами соединений.

В целом показано, что комбинация режимов ГФХ и ОФХ на одной монолитной колонке с дуальным механизмом удерживания является эффективным инструментом для метаболомного скрининга и позволяет реализовать широкий охват метаболитов в рамках одной аналитической платформы.

2. Применение разработанного подхода для решения практических задач метаболомики

2.1 Анализ образцов сухих пятен крови мышей, облученных рентгеновским излучением[1]

Предложенный ВЭЖХ-МС/МС подход был апробирован при метаболомном скрининге образцов сухих пятен крови мышей до и после частичного торакоабдоминального рентгеновского облучения. Данная модель воспроизводит воздействие, применяемое при лучевой терапии опухолей органов грудной и брюшной полости, и позволяет изучать системный метаболический ответ на радиационное повреждение. Использованная доза 5 Гр является полулетальной для мышей при тотальном облучении и обеспечивает развитие выраженного метаболического ответа при сохранении высокой выживаемости животных. Это делает модель пригодной для поиска маркеров радиационного воздействия, а также для последующей оценки радиопротекторных и радиосенсибилизирующих соединений.

Образцы крови отбирали до облучения, а также на 4-е, 7-е и 11-е сутки после воздействия. Пробоподготовку сухих пятен крови проводили по ранее описанному протоколу, а анализ метаболитов выполняли с использованием разработанного комбинированного метода, включающего последовательное применение режимов ГФХ и ОФХ на монолитной колонке VTr. В результате метаболомного скрининга были выявлены 12 метаболитов, содержание которых достоверно изменялось во все исследованные сроки после облучения по сравнению с исходным уровнем (рис. 3).

Все они были детектированы в режиме ГФХ. По направлению изменений эти соединения можно разделить на две группы. К метаболитам с повышенным содержанием после облучения относились 1-метилникотинамид, 3-гидроксилинолеилкарнитин, карнозин и гипоксантин. К метаболитам со сниженным содержанием относились аргинин, цитруллин, индоксилсульфат, L-лизин, L-метионин, пантотеновая кислота, серотонин и мочевина. Помимо указанных метаболитов, дополнительно были выявлены соединения, достоверно отличавшиеся от исходного уровня хотя бы в одной из временных точек. Для каждого сравнения рассчитывали значения VIP, после чего метаболиты дополнительно оценивали по площади хроматографического пика и результатам одномерного статистического анализа. На основании этих данных был проведен анализ метаболических путей, который выполняли с использованием гипергеометрического теста и топологического анализа по относительной междуцентровости; в качестве референсного набора использовали библиотеку путей Mus musculus KEGG.

[1] Облучение мышей проводилось м.н.с. ЛФАВ НИОХ СО РАН М. А. Мельченко. Отбор образцов крови и дальнейшие манипуляции с ними — автором диссертационной работы.

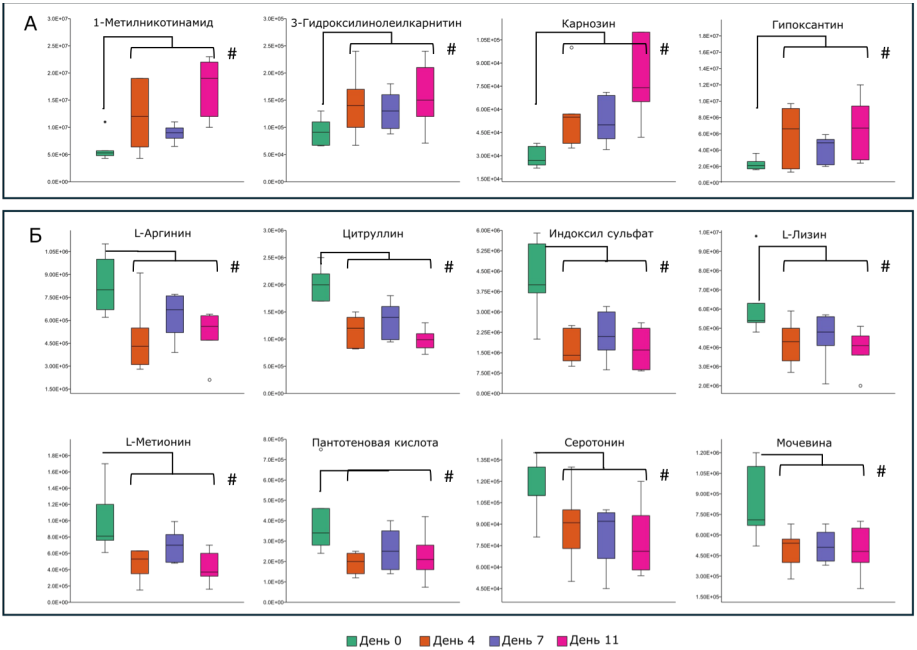


Рис. 3. Метаболиты крови мышей, содержание которых достоверно (# – $p < 0,05$) изменилось на 4, 7 и 11-е сутки после облучения по сравнению с необлученными животными (0-е сутки): А) с положительной динамикой; Б) с отрицательной динамикой. По оси ординат указана площадь пика в абсолютных значениях.

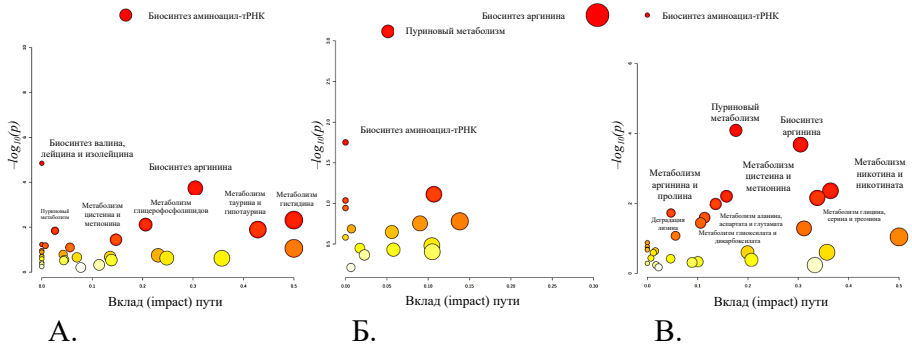


Рис. 4. Анализ метаболических путей, проведенный для метаболитов крови, которые статистически значимо отличались на четвертый (А), седьмой (Б) и одиннадцатый (В) дни после облучения по сравнению со здоровыми животными. По оси абсцисс показано влияние пути, а по оси ординат - log(p).

Установлено, что основные метаболические нарушения после облучения связаны с биосинтезом аминоацил-т-РНК, биосинтезом аргинина, пуриновым обменом, метаболизмом цистеина и метионина, а также обменом аминокислот и азотсодержащих соединений (рис. 4). На 4-е сутки дополнительно выявлялись изменения в глицерофосфолипидном обмене, метаболизме гистидина, таурина и гипотаурина. К 7-м суткам отмечалась частичная компенсация нарушений, тогда как к 11-м суткам вновь проявлялись

изменения в путях обмена аминокислот, деградации лизина, метаболизма глиоксилатов и дикарбоновых кислот, а также никотиновой кислоты и никотинамида.

Повышение содержания 1-метилникотинамида указывает на вовлечение обмена никотинамида и NAD^+-зависимых процессов. Увеличение содержания карнозина отражает активацию антиоксидантных механизмов, тогда как рост гипоксантина свидетельствует о нарушении пуринового обмена и деградации нуклеиновых кислот. Снижение аргинина, цитруллина и мочевины указывает на нарушение обмена азота и цикла мочевины, что согласуется с изменениями пути биосинтеза аргинина. Дополнительное снижение лизина и метионина отражает перестройку аминокислотного обмена. Динамика цитруллина (снижение на 4-е сутки, частичное восстановление к 7-м и повторное снижение к 11-м) соответствует повреждению кишечного эпителия и подтверждает его роль как маркера гастроинтестинального компонента лучевого поражения.

Снижение индоксилсульфата и серотонина может отражать нарушение состояния кишечной микробиоты и барьерной функции кишечника, указывая на вовлечение оси «кишечник — микробиота — системный метаболизм». Снижение содержания пантотеновой кислоты на 4-е сутки с частичной нормализацией через 7 дней, возможно, связано с перестройкой энергетического обмена и метаболизма коэнзима А. Повышение уровня 3-гидроксилинолеилкарнитина указывает на вовлечение обмена жирных кислот и нарушение митохондриального транспорта.

Таким образом, применение комбинированного подхода к анализу метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС позволило выявить динамические изменения метаболома крови мышей после торакоабдоминального облучения. Наиболее информативными являются метаболиты, связанные с обменом аминокислот, пуринов, никотинамида, энергетическим метаболизмом и функцией кишечника. Полученные результаты согласуются с литературными данными и соответствуют представлениям о радиационно-индуцированном повреждении кишечника, нарушении пуринового и аминокислотного обмена и развитии системного ответа на окислительный стресс.

2.2 Исследование содержания сфинголипидов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС [2]

На базе разработанного метода было проведено исследование плазмы крови, взятой у пациентов до кардиохирургической операции, с целью поиска потенциальных липидных маркеров послеоперационного делирия (ПОД). ПОД является одним из значимых осложнений раннего послеоперационного периода и ассоциирован с увеличением длительности госпитализации, частоты осложнений, летальности, а также с нарушением когнитивного и физического восстановления пациентов. С учетом возможной роли липидного обмена в патогенезе нейровоспаления и когнитивных нарушений был выполнен ВЭЖХ-МС/МС анализ сфингомиелинов плазмы крови. Для анализа использовали обращенно-фазовый режим хроматографии на монолитной колонке VTr. Сравнивали две группы пациентов: с развившимся ПОД и без признаков ПОД после кардиохирургического вмешательства.

Всего было проанализировано 9 сфингомиелинов. По результатам сравнения с использованием критерия Манна–Уитни установлено, что содержание четырех соединений статистически значимо отличалось между группами: СМ (d18:1/22:2 OH), СМ (d18:1/24:0), СМ (d18:1/24:1) и СМ (d18:1/22:2) (рис. 5). Во всех случаях у пациентов с ПОД наблюдалось снижение относительного содержания данных сфингомиелинов по сравнению с контрольной группой.

Для проверки гипотезы о связи выявленных изменений с нарушением метаболизма сфинголипидов сотрудниками Лаборатории компьютерной протеомики ИЦиГ СО РАН

[2] Отбор пациентов для исследования, взятие образцов крови и предоставление клинических данных проводились сотрудниками НМИЦ им. Е. Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия) к.м.н. Г. Б. Морозом и В. В. Плеско под руководством д.м.н., чл.-корр. РАН В. В. Ломиворотова.

(рук. к.б.н. В. А. Иванисенко) была выполнена реконструкция и анализ генной сети в программно-информационной системе ANDSystem. Анализ включал регуляцию экспрессии генов, кодирующих ферменты пути KEGG “Sphingolipid metabolism”, а также регуляцию транспорта, активности и деградации соответствующих белков. Анализ перепредставленности заболеваний показал, что регуляторные белки, связанные с метаболизмом сфинголипидов, ассоциированы с нервно-психическими заболеваниями, сердечно-сосудистыми и почечными патологиями, воспалительными процессами, а также оперативным вмешательством.

Поскольку кардиохирургическое вмешательство было выполнено всем пациентам, влияние факторов, связанных с операцией и искусственным кровообращением, вероятно, затрагивало обе группы.

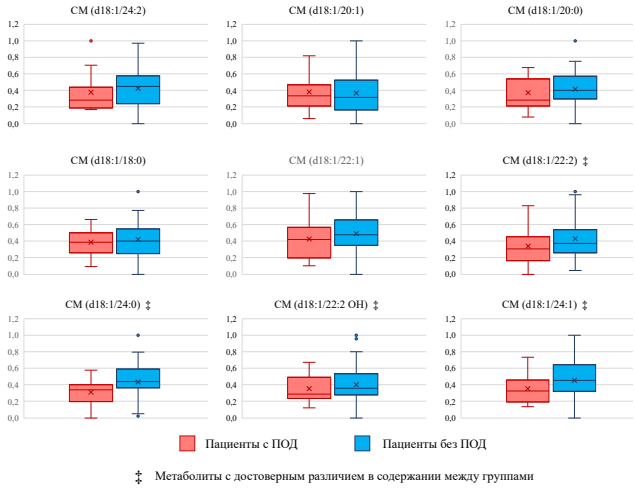


Рис. 5. Относительное содержание сфингомиелинов в плазме крови пациентов после кардиохирургического вмешательства с послеоперационным делирием и пациентов, у которых после кардиохирургического вмешательства делирий не был диагностирован. По оси ординат указаны нормализованные значения площадей пиков.

По этой причине снижение содержания сфингомиелинов у пациентов с ПОД может быть связано с более специфическим нарушением регуляторных механизмов, ассоциированных с нервно-психическими процессами.

Сфингомиелины являются важными компонентами плазматических мембран клеток млекопитающих. При стрессовом воздействии они могут расщепляться сфингомиелиназами с образованием фосфохолина и церамидов, обладающих сигнальными функциями.

Нарушение обмена сфингомиелинов может быть связано с изменением нейромедиаторного баланса, нарушением межнейронных взаимодействий и развитием нейровоспаления, что делает данный класс соединений перспективным для изучения механизмов ПОД. Таким образом, применение разработанного ВЭЖХ-МС/МС подхода позволило выявить снижение содержания ряда сфингомиелинов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием.

2.3 Изучение особенностей метаболизма глиобластомы[3]

В рамках исследования были проанализированы 17 образцов ткани глиобластомы и 15 образцов ткани перитуморального пространства. Анализ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием разработанного подхода. После интегрирования хроматографических пиков было выполнено сравнение содержания метаболитов между группами. Поскольку метаболомные данные, полученные при анализе тканевых образцов, могут характеризоваться неоднородным распределением, различиями в дисперсиях и выраженной межиндивидуальной вариабельностью, для поиска наиболее устойчивых различий был

[3] Отбор пациентов для исследования, взятие образцов ткани и предоставление клинических данных проводились сотрудниками НИИТО к.м.н. С. В. Мишиновым и д.м.н. В. В. Ступаком.

использован бикритериальный подход. Первично сравнение групп проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. При уровне значимости $p < 0,05$ было выявлено 38 метаболитов, содержание которых различалось между тканью глиобластомы и перитуморальной тканью, однако после применения поправки Бенджамини–Хохберга для контроля частоты ложных открытий при FDR = 0,05 ни один метаболит не сохранял статистической значимости.

В связи с этим для более консервативного отбора потенциальных сигнатурных метаболитов дополнительно использовали тест Куккони, чувствительный не только к различиям центральной тенденции, но и к различиям масштаба и формы распределений. Метаболит рассматривали как потенциальный маркер только в том случае, если его содержание достоверно различалось между группами одновременно по двум критериям — тесту Манна–Уитни и тесту Куккони. При использовании теста Куккони число метаболитов с достоверными различиями между группами составило 64, а сопоставление результатов двух критериев позволило выделить 22 метаболита, удовлетворяющих обоим условиям статистической значимости ($p < 0,05$). Логика такого отбора представлена на рис. 6.

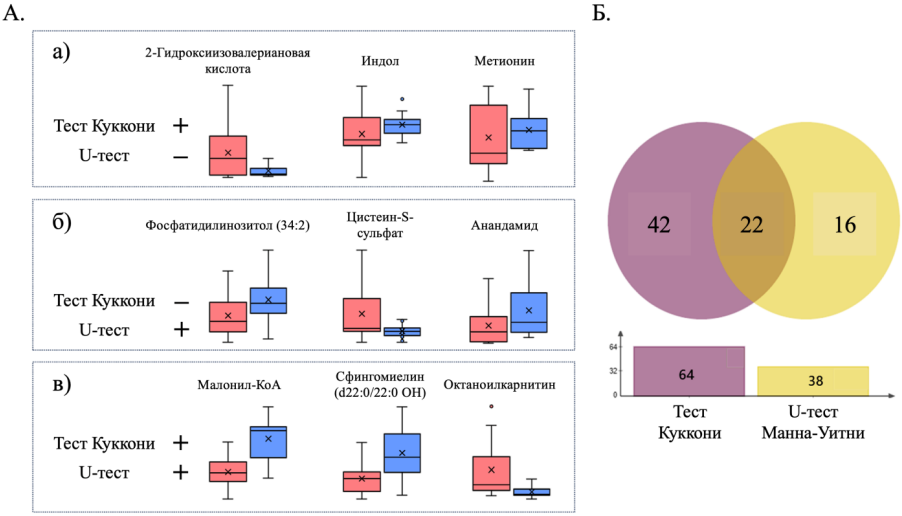


Рис. 6. А) Диаграммы уровней метаболитов, достоверно различающихся согласно тесту Куккони, тесту Манна–Уитни или обоим критериям; Б) пересечение множеств метаболитов, содержание которых достоверно различается между тканью глиобластомы и перитуморальной тканью.

Среди 22 потенциальных маркерных метаболитов были представлены соединения, связанные с липидным обменом, метаболизмом КоА, сфинголипидным обменом, энергетическим метаболизмом и обменом нуклеотидов. К наиболее значимым соединениям относились малонил-КоА, кофермент А, 4-фосфопантотенат, октаноилкарнитин, 2-октеноилкарнитин, деканоилкарнитин, глицерофосфохолин, пироглутамовая кислота, 3-фосфоглицериновая кислота, цитруллин, пурин, а также несколько представителей класса церамидов.

Для полученного набора метаболитов был проведен анализ перепредставленности метаболических путей KEGG с использованием MetaboAnalyst 6.0. Статистически значимо перепредставленным путем оказался метаболизм сфинголипидов ($p = 7,95 \times 10^{-5}$; FDR = $6,36 \times 10^{-3}$). Дополнительно был выявлен путь биосинтеза пантотеновой кислоты и КоА ($p = 0,0115$), однако после поправки на множественное сравнение его значимость не сохранялась (FDR = 0,46).

Таким образом, наиболее выраженные метаболические различия между тканью глиобластомы и перитуморальной тканью были связаны с нарушением сфинголипидного обмена. Среди 22 потенциальных маркеров пять соединений относились к классу церамидов: церамид (d18:1/16:0 OH), церамид (d18:1/16:0), церамид (d18:1/22:0), церамид (d18:1/16:2) и церамид (d18:1/16:1 OH). Их содержание в ткани опухоли было в два и более раза выше, чем в ткани перитуморального пространства; кроме того, для образцов глиобластомы была характерна более высокая дисперсия значений, что отражает метаболическую гетерогенность опухолевой ткани (рис. 7).

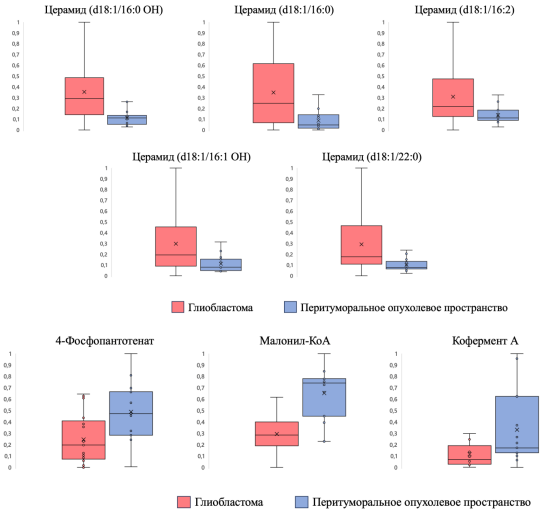


Рис. 7. Содержание маркерных церамидов, а также коэнзима А (КоА) и связанных с ним метаболитов в ткани глиобластомы и перитуморального пространства. По оси ординат представлены нормализованные значения площадей пиков.

Повышение содержания церамидов указывает на перестройку сфинголипидного обмена в ткани глиобластомы. Церамиды являются биоактивными липидными медиаторами, участвующими в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, аутофагии и стрессового ответа. Их накопление может быть связано с изменением активности ферментов биосинтеза, деградации и реутилизации сфинголипидов.

Наряду с изменениями сфинголипидного обмена были выявлены различия в содержании соединений, связанных с биосинтезом КоА и липидов *de novo*. В ткани глиобластомы было снижено содержание кофермента А и малонил-КоА, тогда как содержание 4-фосфопантотената было повышено. Эти изменения могут отражать перераспределение метаболического потока в сторону активного использования КоА-зависимых реакций, синтеза и ремоделирования липидов.

Малонил-КоА является ключевым промежуточным метаболитом липогенеза и регулятором транспорта жирных кислот в митохондрии через ингибирование карнитин-пальмитоилтрансферазы-I. Снижение его содержания в опухолевой ткани может указывать на усиление использования липидных субстратов и изменение баланса между синтезом и окислением жирных кислот. Снижение содержания КоА и малонил-КоА в сочетании с повышением уровня 4-фосфопантотената может свидетельствовать о нарушении КоА-зависимого метаболизма и повышенной потребности опухолевых клеток в липидном ремоделировании.

Таким образом, применение бикритериального анализа позволило выделить набор потенциальных сигнатурных метаболитов ткани глиобластомы, наиболее информативно отражающих различия между опухолевой и перитуморальной тканью. Наиболее значимые изменения были связаны с метаболизмом сфинголипидов и КоА-зависимыми путями липидного обмена. Полученные результаты указывают на выраженную перестройку липидного метаболизма в ткани глиобластомы и обосновывают дальнейшее изучение ферментов биосинтеза и деградации церамидов как потенциальных молекулярных мишеней.

3. Разработка протокола пробоподготовки для метаболомного скрининга клеточных образцов

3.1 Особенности и ключевые этапы пробоподготовки клеточных образцов: обоснование методического подхода [4]

Протокол пробоподготовки клеточных образцов был разработан на основе ранее описанных методик (Schönberger K, 2023; Bi H., 2013) и адаптирован для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа. Ключевые этапы протокола пробоподготовки представлены на рис. 8.

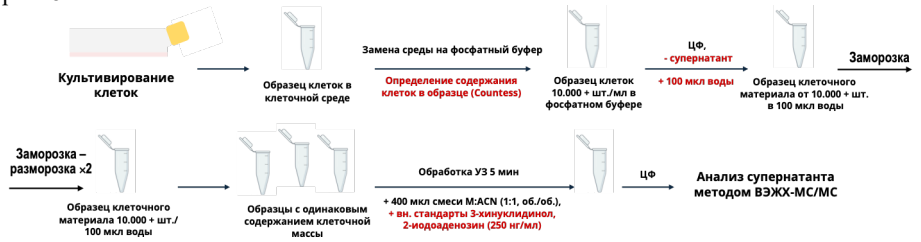


Рис. 8. Схема протокола пробоподготовки клеточных образцов для метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. ЦФ – центрифугирование; УЗ – обработка ультразвуком.

Для апробации подхода использовали две адгезивные линии меланомы: человеческую SK-MEL-28 и мышиную B16. Сходство их морфологических и таксономических характеристик позволяет предположить сопоставимость метаболических процессов, а также ожидаемую зависимость содержания метаболитов и липидов от размера клетки.

Количественный учет клеток осуществляли с использованием автоматического счетчика, обеспечивающего высокую воспроизводимость и упрощающего контроль качества образцов. Несмотря на то, что данный подход не позволяет выделять отдельные клеточные субпопуляции, он является достаточным для задач скринингового метаболомного анализа. При необходимости протокол может быть дополнен этапом селективной сортировки клеток (например, с использованием магнитных наночастиц), что позволит повысить специфичность анализа, однако требует более сложной инфраструктуры и не является оптимальным для рутинных исследований.

После подсчета клетки дважды промывали раствором DPBS для удаления компонентов культуральной среды. Ключевой особенностью разработанного протокола являлась последующая замена буфера на воду высокой степени очистки (Milli-Q). В предварительных экспериментах было показано, что замена DPBS на воду приводит к существенному увеличению интенсивности аналитического сигнала и позволяет детектировать ряд полярных метаболитов, отсутствующих при использовании буферного раствора. Данный эффект обусловлен подавлением ионизации неорганическими солями, содержащимися в DPBS, что снижает чувствительность масс-спектрометрического анализа. Клетки осаждали центрифугированием при 1000×g в условиях, не индуцирующих клеточный стресс, после чего надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в воде. Использование гипотонической среды обеспечивало быстрый лизис клеток и прекращение метаболической активности. Применение воды на данном этапе является критически важным, поскольку соли буфера способны коэлюировать с полярными метаболитами в условиях гидрофильной хроматографии, снижая эффективность ионизации.

Следует отметить, что при работе с малыми количествами клеток визуализация осадка затруднена, что требует повышенной аккуратности при удалении надосадочной жидкости во избежание потери образца. Несмотря на это, все этапы пробоподготовки

[4] Клетки были предоставлены д.б.н. Разумовым И. А. (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН).

могут быть выполнены в стандартной лаборатории клеточных культур с использованием базового оборудования, что делает метод доступным для широкого применения.

Для осаждения белков использовали смесь метанола и ацетонитрила (1:1, об. / об.), что обеспечивает эффективное извлечение метаболитов и совместимо с последующим ВЭЖХ-МС/МС анализом. Для нормализации сигналов применяли внутренние стандарты: 3-хинуклидинол для режима гидрофильной хроматографии и 2-иодаденозин для режима ОФХ. Площади пиков метаболитов нормировали на соответствующие внутренние стандарты, после чего использовали полученные значения для дальнейшего статистического анализа.

Таким образом, разработанный протокол пробоподготовки обеспечивает эффективное извлечение метаболитов, минимизацию матричных эффектов и повышение чувствительности анализа, что делает его пригодным для метаболомного скрининга клеточных образцов методом ВЭЖХ-МС/МС.

3.2 Исследование метаболомного покрытия при анализе образцов клеток с разным количеством клеток

Конечный образец представлял собой экстракт метаболитов, полученный из заданного количества клеток и растворенный в 500 мкл смеси воды, метанола и ацетонитрила (1:2:2, об. /об. /об.). В ходе анализа было зарегистрировано 568 MRM-переходов для клеточных образцов и контрольных проб (растворитель). После интегрирования пиков ($S/N \geq 5$) оценивали метаболомное покрытие — число достоверно детектируемых метаболитов. Для этого площади пиков сравнивали с контролем по критерию Манна–Уитни; значимыми считали различия при $U \leq 1$ при условии превышения сигнала в клеточных образцах над контролем. Порог детекции существенно варьировал для разных метаболитов. Для количественной оценки влияния числа клеток анализировали образцы в диапазоне 10–1000 тыс. клеток. В обоих режимах наблюдался резкий рост покрытия при увеличении числа клеток с 10 тыс. до 100 тыс., после чего рост замедлялся и выходил на плато.

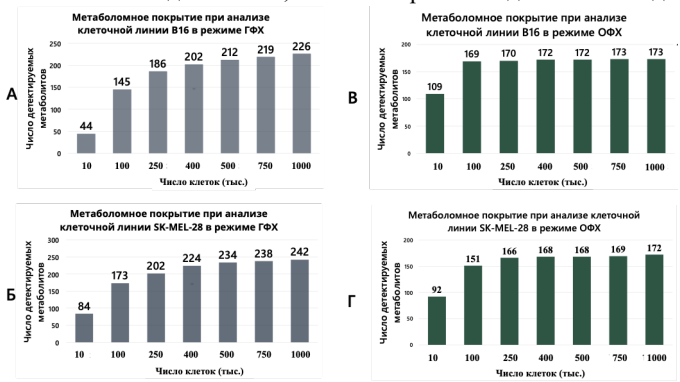


Рис. 9. Зависимость метаболомного охвата от количества клеток в клеточных линиях B16 и SK-MEL-28 при анализе в режимах ГФХ и ОФХ. А — B16, ГФХ; Б — B16, ОФХ; В — SK-MEL-28, ГФХ; Г — SK-MEL-28, ОФХ. Представлены столбчатые диаграммы числа детектируемых метаболитов в зависимости от количества клеток в образце (10, 100, 250, 400, 500, 750 и 1000 тыс.). По оси ординат указано число детектируемых метаболитов.

Для липидных метаболитов, определяемых в режиме ОФХ, на начальном участке (до ~ 750 тыс. клеток) также наблюдается рост сигнала, однако при высоких клеточных нагрузках проявляется нелинейность, вероятно связанная с матричными эффектами и подавлением ионизации в источнике электрораспыления.

Для линии B16 в режиме ГФХ число детектируемых метаболитов увеличивалось с 44 (10 тыс. клеток) до 145 (100 тыс.) и далее выходило на плато (~219–226 при 500–1000 тыс.). Для линии SK-MEL-28 наблюдалась сходная динамика: 84 → 173 (10 → 100 тыс.) и далее насыщение (~238–242 при 500–1000 тыс.). Аналогичная картина отмечена в режиме

ОФХ: для B16 — 109 → 169 (10 → 100 тыс.) с выходом на плато ~172–173; для SK-MEL-28 — 92 → 151 с последующим насыщением ~168–172 (рис. 9).

В то же время статистически показано, что для ряда липидов, в отличие от полярных метаболитов (рис. 10А), различия между 750 тыс. и 1 000 тыс. клеток могут быть недостоверны, несмотря на ожидаемый рост концентрации, что указывает на выход сигнала за пределы линейного диапазона (например, фосфатидовая кислота, рис. 10Б).

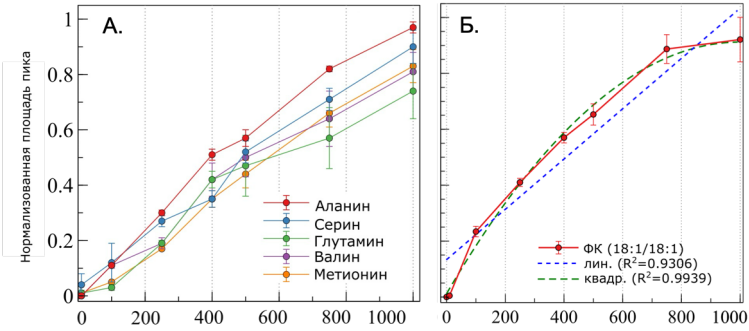


Рис. 10. Зависимость нормированных площадей пиков метаболитов на хроматограммах от количества клеток в образце (по оси абсцисс) в линии B16. А — аминокислоты; Б — фосфатидовая кислота (18:1/18:1) с линейной и квадратичной аппроксимацией (R^2 указаны в легенде). Точки — средние значения, отрезки — ±SD (n = 4).

Это создает риск не детектировать биологические различия при избыточной клеточной массе. В целом, для обеих клеточных линий оптимальным является диапазон 100–500 тыс. клеток на пробу: при меньшем числе клеток ограничено метаболомное покрытие, при большем — возможны нелинейные эффекты и насыщение сигнала.

Таким образом, показано, что разработанный протокол позволяет проводить метаболомный скрининг методом ВЭЖХ-МС/МС в образцах начиная с 10 000 клеток, однако оптимальным диапазоном для линий SK-MEL-28 и B16 является 400 000–500 000 клеток. В этом диапазоне достигается широкий охват метаболома, включая полярные соединения и липиды, без выраженных эффектов насыщения аналитического сигнала. При интерпретации результатов необходимо учитывать не только число клеток, но и их размер, поскольку одинаковое количество клеток разных линий может соответствовать различной биомассе и, следовательно, различному содержанию метаболитов. Поэтому при планировании экспериментов целесообразно строить калибровочные зависимости для каждой клеточной линии. Протокол является доступным и воспроизводимым и может быть адаптирован для изучения метаболического ответа клеток на лекарственные препараты, стрессовые воздействия, изменения условий культивирования, а также процессов апоптоза, деления и дифференцировки. Его основное ограничение связано с невозможностью анализа отдельных клеточных субпопуляций без предварительного сортинга.

3.3 Исследование воздействия терагерцового излучения на метаболизм клеток SK-MEL-28[5]

Применение разработанного протокола пробоподготовки адгезивных клеточных культур в сочетании с целевым анализом методом ВЭЖХ-МС/МС позволило выявить изменения метаболомного профиля клеток SK-MEL-28 после воздействия терагерцового излучения. Наиболее выраженные изменения затрагивали метаболизм пуринов: наблюдалось снижение содержания АТФ, АДФ, АМФ, аденозина и аденина при одновременном повышении уровней гипоксантина и ксантина (рис. 11).

[5] Облучение клеток проводилось м.н.с. НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН Бутиковой Екатериной Алексеевной совместно с коллективом НЛСЭ (Лаборатория 8.1 ИЯФ СО РАН).

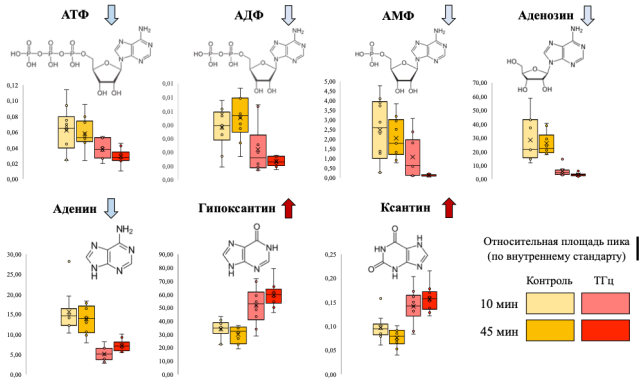


Рис. 11. Относительное содержание пуриновых метаболитов в клетках SK-MEL-28 после воздействия ТГцИ.

Такое смещение в сторону продуктов деградации свидетельствует о нарушении энергетического обмена и усилении катаболических процессов в клетке. Параллельно были зафиксированы изменения липидного профиля, в частности повышение содержания ряда церамидов (рис. 12).

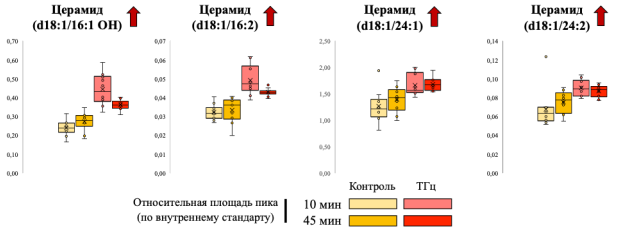


Рис. 12. Изменения содержания церамидов в клетках SK-MEL-28 после воздействия ТГцИ.

Церамиды являются ключевыми сигнальными молекулами сфинголипидного обмена и участвуют в регуляции клеточного стресса, апоптоза и метаболической адаптации.

Совокупность наблюдаемых изменений — дисрегуляция пуринового обмена и накопление церамидов — указывает на вовлечение процессов энергетического и липидного метаболизма в клеточный ответ на воздействие ТГцИ и согласуется с предположением о роли митохондриально-ассоциированных механизмов в реализации данного ответа.

Заключение

Разработан и апробирован подход к целевому метаболомному анализу биологических образцов различной природы на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием органической монолитной колонки на основе сополимеров стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола. Ключевой особенностью предложенного подхода является возможность проведения анализа в режимах ГФХ и ОФХ с использованием одной колонки и одной пары элюентов, что позволяет расширить охват детектируемых метаболитов без применения двумерных хроматографических схем.

Показано, что сочетание полимерного монолитного сорбента, устойчивого в щелочной области pH, с летучей карбонатной буферной системой обеспечивает эффективный анализ широкого спектра эндогенных метаболитов, включая полярные низкомолекулярные соединения и липидные молекулы, с высокой чувствительностью, стабильностью и воспроизводимостью хроматографических характеристик. Была показана применимость разработанного подхода к метаболомному анализу плазмы крови, сухих пятен крови, образцов биологических тканей и клеточных культур.

С использованием разработанного подхода были установлены статистически значимые метаболомные различия при исследовании патогенеза послеоперационного делирия и опухолевого роста глиобластомы, а также метаболомный ответ на рентгеновское

излучение *in vivo* и терагерцовое излучение *in vitro*. На основе полученных метаболомных данных сформулированы гипотезы о молекулярных механизмах патологических процессов. Разработан и методически обоснован протокол пробоподготовки адгезивных клеточных культур, адаптированный к задачам целевого метаболомного анализа, что расширяет возможности использования предложенного подхода для клеточных исследований.

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный подход представляет собой воспроизводимую и универсальную аналитическую платформу, пригодную для решения широкого круга задач метаболомных исследований биологических систем различной сложности.

Выводы

1. Показано, что монолитная колонка на основе 1-винил-1,2,4-триазола обеспечивает разделение метаболитов как в режиме обращённо-фазовой, так и гидрофильной хроматографии. Последовательное применение двух режимов является комплементарным, увеличивает охват метаболитов различных классов и позволяет детектировать около 400 соединений за суммарное время анализа менее 30 мин. Сравнение разработанного метода с методами, использующими коммерчески доступные колонки с сорбентами различных типов, показало, что он обеспечивает более широкий метаболомный охват.
2. Для клеточных линий меланомы человека SK-MEL-28 и мыши B16 оптимизирован протокол пробоподготовки для целевого метаболомного анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. Протокол позволяет детектировать метаболиты в образцах, содержащих от 10 000 клеток, а оптимальный метаболомный охват достигается при анализе 400 000–500 000 клеток.
3. С использованием разработанного подхода в плазме крови пациентов старше 65 лет до операции на сердце в условиях искусственного кровообращения выявлены четыре сфингомиелина — СМ (d18:1/22:2 OH), СМ (d18:1/24:0), СМ (d18:1/24:1) и СМ (d18:1/22:2), содержание которых у пациентов с послеоперационным делирием было статистически значимо снижено по сравнению с контрольной группой.
4. В тканях первичной глиобластомы по сравнению с перитуморальной тканью выявлено повышенное содержание церамидов и сниженное содержание кофермента А и малонил-КоА, а также статистически значимое изменение содержания ряда других метаболитов, что в совокупности может указывать на изменение β-окисления жирных кислот. Анализ метаболических путей показал статистически значимые изменения метаболизма сфинголипидов в ткани глиобластомы.
5. Разработанный подход позволил выявить метаболические изменения при воздействии ионизирующего и неионизирующего излучения: анализ метаболитов крови мышей после облучения рентгеном в полулетальной дозе показал изменения в метаболизме, указывающие на дисрегуляцию путей биосинтеза аминоацил-т-РНК, аргинина, а также метаболизма пуринов и ряда аминокислот, а после воздействия терагерцового излучения на клетки меланомы SK-MEL-28 — изменение содержания 40 метаболитов, преимущественно связанных с обменом пуринов и пиримидинов.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, к.х.н. А. Д. Рогачеву, за постановку задач исследования, постоянное внимание к работе, обсуждение результатов и поддержку на всех этапах ее выполнения, а также за переданные знания и опыт в области ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Особую признательность автор выражает за атмосферу открытого научного диалога, в рамках которого различия во взглядах не только допускались, но и поощрялись, становясь важным фактором формирования научного мышления.

Автор благодарит чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. А. Г. Покровского за научное наставничество, к.т.н. Е. В. Гайслера за обучение исследовательскому анализу данных и поддержку на всех этапах работы, заведующего Лабораторией компьютерной протеомики ИЦиГ СО РАН к.б.н., доц. В. А. Иванисенко, а также заведующего Лабораторией молекулярной патологии д.б.н., проф. В. О. Пустыльняка.

Автор благодарит сотрудников Лаборатории физиологически активных веществ под руководством чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Н. Ф. Салахутдинова за возможность реализации совместных проектов и дружественную, теплую атмосферу. Отдельную благодарность автор выражает д.х.н. доц. О. И. Яровой и М. А. Мельченко за помощь в проведении облучения животных, д.х.н., проф. РАН К. П. Волчо и д.х.н. О. А. Лузиной за внимательное прочтение текста диссертации. Автор выражает благодарность сотрудникам Лаборатории фармакологических исследований: д.б.н., проф. Т. Г. Толстиковой за предоставление животных, а также ценные советы при подготовке рукописи, к.б.н. С. В. Анькову и д.б.н., доценту М. В. Хвостову за помощь в проведении фармакологических экспериментов. Особую признательность автор выражает к.х.н. Ю. В. Патрушеву и к.х.н. Ю. С. Сотниковой за предоставление монолитных хроматографических колонок, с исследования которых началось выполнение настоящей диссертации. Автор благодарит сотрудников ИЦиГ СО РАН за помощь в проведении клеточных работ: Е. А. Бутикову и д.б.н. И. А. Разумова. Автор благодарит коллектив лаборатории 8.1 ИЯФ СО РАН и лично к.ф.-м.н. В. М. Попика за участие в совместных работах.

Особые слова благодарности автор выражает своим коллегам, студентам НГУ и учащимся СУНЦ НГУ — за постоянный научный диалог, вопросы и обсуждения, которые нередко становились источником новых идей и дополнительной мотивации, в особенности П. И. Брит, М. А. Сотникову, М. К. Лысенко, Ю. А. Затолоцкую и А. С. Титенко. Автор благодарит к.х.н. А. А. Фирсову за источник мотивации при подготовке диссертации.

Автор благодарит Факультет естественных наук НГУ и своих учителей — к.х.н., заведующую кафедрой химии СУНЦ НГУ С. Г. Барам и с признательностью вспоминает д.х.н., доцента В. А. Емельянова, которые помогли полюбить химию. Наконец, автор выражает благодарность маме А. В. Басовой и папе В. А. Басову, а также близким и друзьям, в особенности Н. Д. Сидоренко, за неизменную поддержку, терпение, любовь и заботу на протяжении всех лет учебы, а также в процессе проведения исследований и написания настоящей диссертации.

Список публикаций по теме диссертации

1. **Basov N.V.**, Rogachev A.D., Aleshkova M.A., Gaisler E.V., Sotnikova Yu.S., Patrushev Yu.V., Tolstikova T.G., Yarovaya O.I., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole. Talanta. 2024. V.267. 125168.
2. Иванисенко В.А., **Басов Н.В.**, Макарова А.А., Вензель А.С., Рогачев А.Д., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Клещев М.А., Гайслер Е.В., Мороз Г.Б., Плеско В.В., Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Ломиворотов В.В., Колчанов Н.А., Покровский А.Г. Применение генных сетей к анализу результатов метаболомного скрининга плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием. Вавиловский журнал генетики и селекции/Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii. 2023. Т.27. №7. С.768-775.
3. **Басов Н.В.**, Адамовская А.В., Рогачев А.Д., Гайслер Е.В., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Вензель А.С., Мишинов С.В., Ступак В.В., Чересиз С.В., Олешко О.С., Бутикова Е.А., Осечкова А.Е., Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Поздняков А.С., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А., Покровский А.Г. Изучение особенностей метаболизма тканей глиобластомы и перитуморального пространства при использовании целевого метаболомного скрининга методом ВЭЖХ-МС/МС и генных сетей. Вавиловский журнал генетики и селекции/Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii. 2024. Т.28. №8. 117146.
4. **Basov N.V**., Butikova E.A., Sotnikova M.A., Razumov I.A., Sotnikova Yu.S., Patrushev Yu.V., Rogachev A.D., Salakhutdinov N.F., Pokrovsky A.G. Features of sample preparation of cell culture samples for metabolomic screening by LC-MS/MS. J Pharm Biomed Anal. 2026. V. 267. P. 11714.
5. Butikova E.A., **Basov N.V.**, Rogachev A.D., Gaisler E.V., Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Makarova A.A., Ivanisenko T.V., Razumov I.A., Kolomeyets D.A., Cheresiz S.V., Solovieva O.I., Larionov K.P., Sotnikova Yu.S., Patrushev Yu.V., Kolchanov N.A., Pokrovsky A.G., Vinokurov N.A., Kanygin V.V., Popik V.M., Shevchenko O.A. Metabolomic and gene networks approaches reveal the role of mitochondrial membrane proteins in response of human melanoma cells to THz radiation. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2025. V. 1870. №2. P. 159595.

Басов Никита Вячеславович

Разработка и применение подхода к целевому метаболомному анализу методом ВЭЖХ-МС/МС на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола

Специальность 1.5.4 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Подписано в печать 17.08.2026 г.
Формат 60x84/16. Уч.-изд. л. 1,25. Усл. печ. л. 1,1.
Тираж 150 экз. Заказ № 191
Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2