

Применение таргетированного метаболомного скрининга клеток методом ВЭЖХ-МС/МС в изучении биологических эффектов ТГц-излучения

Басов Н.В.^{1, 2}, Бутикова Е.А.^{1, 3*}, Рогачев А.Д.^{1, 2}, Сотникова М.А.¹, Гайслер Е.В.¹, Разумов И.А.^{1, 3, 4}, Соловьева О.И.^{1, 3, 4}, Сотникова Ю.С.^{1, 2, 5}, Патрушев Ю.В.^{1, 5}, Коломеец Д.А.³, Каныгин В.В.^{1, 3}, Попик В.М.³, Покровский А.Г.¹

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

⁵ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

* katabutikova@gmail.com

Ключевые слова: пробоподготовка; метаболомика; пробоподготовка клеток; ТГц; метаболомика клеток

Мотивация и цель: Метаболомика – концепция в биоаналитической химии, целью которой является количественная оценка набора малых молекул (с молекулярной массой менее 1.5 кДа), присутствующих в биологической системе в любом из ее физиологических состояний. Таргетированный скрининг метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) может служить удобным и чувствительным инструментом для выявления ранних изменений в живых системах на молекулярном уровне. Ранее нами был разработан подход к метаболомному скринингу методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола, который позволил детектировать более 400 метаболитов за один анализ [1].

Терагерцовое излучение (терагерцовые волны, субмиллиметровое излучение, Т-лучи, Т-волны, ТГц) находится между микроволновой и инфракрасной областями электромагнитного спектра, диапазон которого определяется от частот 100 ГГц до 10 ТГц [2]. Изучение потенциального воздействия Т-волн на биологические системы востребовано для актуализации протоколов безопасности ТГц и разработки большого числа его практических приложений. Биологические эффекты ТГц-излучения сложны в определении, а метаболомный подход применим в установлении тонких биохимических изменений, индуцированных электромагнитным излучением.

Целью работы являлась разработка подхода к пробоподготовке и таргетированному метаболомному скринингу клеток для поиска биохимических изменений в клетках в ответ на ТГц-излучение.

Методы и алгоритмы: В данном исследовании было проведено облучение клеток линии SK-MEL-28 (модель меланомы человека) на Новосибирском лазере на свободных электронах (НЛСЭ) [3] с параметрами: 2.3 ТГц, длина волны 130 мкм

в течение 10 и 45 минут. Клеточные образцы анализировали ВЭЖХ-МС/МС в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии.

Результаты. Было показано, что в биологических образцах, полученных из 10 тысяч клеток, можно обнаружить ряд полярных метаболитов и липидов, однако наибольшее количество обнаруженных метаболитов достигается при анализе образцов от 500 тысяч клеток и выше.

Подход к анализу клеточных образцов был применен для метаболомного скрининга клеток, облученных ТГц на НЛСЭ «Изучение воздействия ТГц излучения на живые системы». Метаболомный анализ позволил получить данные о содержании 407 метаболитов, из которых 40 значительно отличались между группами облученных ТГц клеток и контрольной группой. Наблюдались изменения в содержании метаболитов, включая пути метаболизма пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. Наиболее значительные изменения отмечены в пуриновом метаболизме, где наблюдалось систематическое снижение содержания метаболитов, таких как АТФ, АДФ и АМФ, в то время как содержание продуктов деградации нуклеотидов, таких как ксантин и гипоксантин, увеличивалось. Значительные изменения также выявлены в пиримидиновом метаболизме, где как при 10-минутном, так и при 45-минутном облучении отмечено повышение конечных метаболитов, таких как уридин и урацил. Это первое исследование, где применяется метаболомный скрининг в биологических образцах, облученных ТГц, которое демонстрирует ТГц-индуцированные метаболические изменения в клетках человека. Полученные результаты могут свидетельствовать о нарушении функций энергетических систем клеток.

Выводы: Результаты работы показывают, что облучение клеток меланомы ТГц приводит к комплексным изменениям в их метаболическом профиле. Эти изменения включают снижение содержания ключевых метаболитов энергетического обмена, таких как АТФ, и увеличение продуктов их деградации. Отмечено, что разработанный нами подход позволяет получать наиболее полную картину метаболомного профиля при анализе от 500 тысяч клеток в образце, что может быть использовано при изучении экзогенных эффектов на редких клетках. Исходя из наших результатов, метаболомика является эффективным инструментом для изучения механизмов действия терагерцового излучения на клеточном уровне, а результаты метаболомного скрининга могут быть полезны в понимании биологических эффектов терагерцового излучения и разработке стратегий безопасности его применения в различных областях.

Финансирование: Работа выполнена на уникальной установке Новосибирский лазер на свободных электронах на базе ЦКП «Сибирский центр синхротронного и терагерцового излучения» при поддержке гранта РНФ (Проект No. 19-72-202). Исследование клеток поддержано средствами государственного задания БЧ 2020-0039-1. Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС поддержан средствами государственного задания No. FSUS-2020-0035. Изготовление монолитных колонок для HPLC поддержано средствами проекта No. FWUR-2024-0032.

The use of targeted metabolomic cell screening by LC-MS/MS in the study of the effects of THz radiation

Basov N.V.^{1,2}, Butikova E.A.^{1,3*}, Rogachev A.D.^{1,2}, Sotnikova M.A.¹, Gaisler E.V.¹, Razumov I.A.^{1,3,4}, Solovieva O.I.^{1,3,4}, Sotnikova Y.S.^{1,2,5}, Patrushev Y.V.^{1,5}, Kolomeyets D.A.³, Kanygin V.V.^{1,3}, Popik V. M.³, Pokrovsky A.G.¹

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁵ Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia

* katabutikova@gmail.com

Key words: sample preparation; metabolomics; preparation of cells; THz; cell metabolomics

Motivation and Aim: Metabolomics is a branch of bioanalytical chemistry that aims to quantify small molecules (with a molecular weight less than 1.5 kDa) in biological systems in various physiological states. High-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection (LC-MS/MS) is a powerful tool for targeted screening of metabolites, allowing for the detection of early changes at the molecular level in living systems. Previously, we developed a method for metabolomic screening using LC-MS/MS with a monolithic column made from 1-vinyl-1,2,4-triazole [1]. This approach allowed us to detect more than 400 different metabolites in a single analysis. Terahertz radiation, also known as terahertz waves, submillimeter radiation, T-rays or THz, is located between the microwave and infrared regions of the electromagnetic spectrum. This range is determined by frequencies between 100 GHz and 10 THz [2]. The study of potential effects of this radiation on biological systems is important for updating safety protocols and developing practical applications. However, it is difficult to determine the biological effects of terahertz radiation due to its subtle nature. The metabolomic approach can be used to identify biochemical changes caused by electromagnetic radiation. The goal of this work was to develop a method for sample preparation and targeted metabolomics screening of cells in order to identify biochemical changes in response to terahertz radiation.

Methods and Algorithms: In this study, the cells of the SK-MEL-28 line (human melanoma model) were irradiated using the Novosibirsk Free Electron Laser (NovoFEL) [3] with parameters: 2.3 THz, wavelength 130 μm for 10 and 45 minutes. Cell samples were analyzed by LC-MS/MS in hydrophilic and reverse-phase chromatography modes.

Results: It has been shown that a number of polar metabolites and lipids can be detected in biological samples obtained from 10,000 cells or more. However, the largest number of metabolites detected is achieved when analyzing samples from 500,000 or more cells. The approach to the analysis of cell samples was used for the metabolomic screening of cells exposed to THz radiation in the NovoFEL study "Investigating the effects of THz radiation on living systems". Metabolomic analysis allowed us to obtain data on the content of 407 metabolites, 40 of which differed significantly between the groups of THz-irradiated cells and the control group. Changes in the content of metabolites were observed, including in the metabolic pathways of purine and pyrimidine nitrogenous bases. The most significant changes occurred in purine metabolism, where a systematic

decrease in the content of ATP, ADP, and AMP was noted, while the levels of nucleotide degradation products, such as xanthine and hypoxanthine, increased. Significant changes were also found in pyrimidine metabolism. Both 10- and 45-minute irradiations showed an increase in the levels of end metabolites, such as uridine and uracil. This is the first study to use metabolomics screening in biological samples exposed to THz radiation, which demonstrates THz-induced metabolic changes in human cells. The results obtained suggest that the energy systems of these cells may be disrupted.

Conclusion: The results show that the irradiation of melanoma cells with THz leads to complex changes in their metabolic profile. These changes include a decrease in the levels of key metabolites involved in energy metabolism, such as ATP, and an increase in the levels of their degradation products. It is noted that our developed approach allows us to obtain a more complete picture of the metabolomic profile by analyzing 500,000 cells in a sample. This can be used to study the effects of exogenous factors on rare cells. Based on our findings, metabolomics is an effective tool for investigating the mechanisms of terahertz radiation action at the cellular level. The results of metabolomic screening can provide valuable insights into the biological effects of this radiation and help develop safety strategies for its use in various fields.

Funding: The experimental part of the study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (Project No. 19-72-202) at the unique Novosibirsk Free Electron Laser installation using equipment from the Siberian Center for Synchrotron and Terahertz Radiation. The funds of the state task number BC 2020-0039-1 were involved in the work. LC-MS/MS analysis has been conducted with the support of a state project No. FSUS-2020-0035. The preparation of monolithic columns for HPLC has been conducted with the support of a state project No. FWUR-2024-0032.

Список литературы/References

1. Basov N.V., Rogachev A.D. et al. 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;267:125168. doi 10.1016/j.talanta.2023.125168
2. Ghann W., Uddin J. Terahertz (THz) spectroscopy: a cutting-edge technology. ed. by J. Uddin. USA: Coppin State University. 2017;1:3-20. doi 10.5772/67031
3. Kulipanov G.N. et al. Novosibirsk free electron laser-facility description and recent experiments. *IEEE Trans Terahertz Sci Technol*. 2015;5(5):798-809. doi 10.1109/TTHZ.2015.2453121