

Динамика метаболома клеточной линии HepG2 при CoCl_2 -индуцированной гипоксии по данным GC×GC-MS: отслеживание ответа с оптимизированным протоколом нормализации

Научный руководитель – Поверенная Екатерина Владимировна

Курбатов Илья Юрьевич

Аспирант

НИИ биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, Москва, Россия

E-mail: kurbatild@gmail.com

Клеточные линии незаменимы в современных исследованиях наук о жизни, однако их молекулярная стабильность варьируется в зависимости от внешних условий, что затрудняет воспроизводимость омикс-данных. Надёжные протоколы нормализации критически важны для сопоставления метаболомных профилей между образцами. Целью работы являлось сравнение методов нормализации данных GC×GC-MS для клеточных линий и выбор оптимального подхода, обеспечивающего достоверный пролонгированный анализ метаболома HepG2 в контрольных условиях и при воздействии хлорида кобальта (CoCl_2) для оценки эффектов химически индуцированной гипоксии.

Систематически оценены стратегии нормализации для клеток HepG2: общий белок и двухцепочечная ДНК (из лизата или осадка после экстракции метаболитов), а также экстрагированный ионный ток (ХИС). Протестированы три экстрагента ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ 7:2:1, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 8:2, $\text{ACN}/\text{IPA}/\text{H}_2\text{O}$ 3:3:2) на пробах с 1–6 млн клеток. В контролируемых условиях площади пиков метаболитов демонстрировали наилучшую корреляцию с концентрациями белка и ДНК в осадке после экстракции ($R^2 > 0.90$) и воспроизводимость после нормализации ($\text{CV} < 30\%$ для большинства метаболитов), причём $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ обеспечивал оптимальный охват метаболома. Данный протокол (белок из осадка + $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$) применён в основном эксперименте.

Клетки HepG2 инкубировали с CoCl_2 в течение двух месяцев для моделирования хронической гипоксии с отбором проб в несколько временных точек. Анализ GC×GC-MS выявил 70 метаболитов с выраженными изменениями. На поздних временных точках уридин повышался на 33%, а молочная кислота снижалась на 20%.

Оптимизированная нормализация на белок из осадка обеспечила надёжное сопоставление метаболомного ответа HepG2 на CoCl_2 между пробами и временными точками, исключив артефакты, связанные с количеством клеток, и выявив гипоксия-специфичную метаболическую перестройку: усиление нуклеотидной репарации и снижение гликолиза.

Иллюстрации

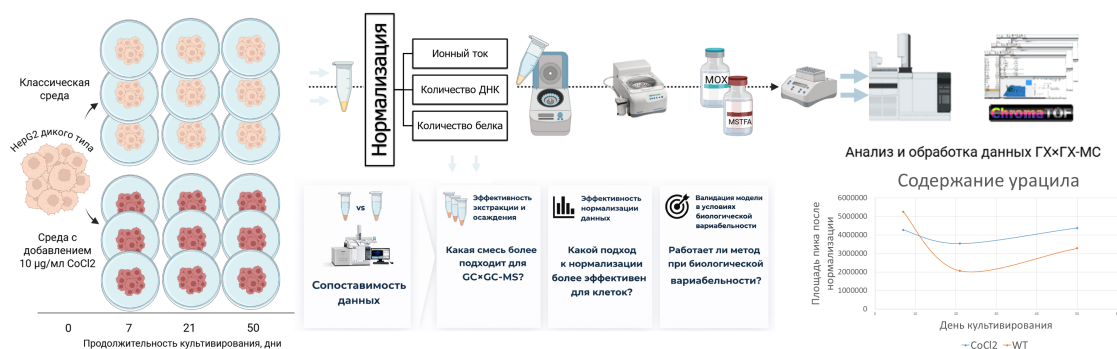


Рис. : Графический абстракт