

Abstract

The rapid evolution of omics sciences is profoundly transforming biomedical research and accelerating the shift toward precision and personalized medicine. Among omics disciplines, metabolomics holds a distinctive role as it provides a direct functional snapshot of biochemical activity, integrating genetic, epigenetic, and environmental influences. Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) has become the gold standard for metabolomics and lipidomics; however, achieving comprehensive metabolome coverage remains challenging due to the vast chemical diversity and dynamic concentration range of small molecules.

This PhD project focuses on the development and optimization of advanced LC-MS-based multi-omics strategies designed to improve analytical performance, expand metabolome coverage, and enable high-sensitivity profiling of limited biological material. In the first phase, reversed-phase (RP) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) workflows were systematically optimized for untargeted metabolomics using human plasma as a complex reference matrix. A peak-quality–based evaluation framework was implemented to assess chromatographic robustness, reproducibility, and overall data quality. The combined use of complementary RP and HILIC platforms markedly enhanced metabolome coverage while maintaining rigorous analytical standards.

The optimized platform was next applied to a clinically relevant study of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with hepatitis C virus (HCV) infection. Integrated untargeted metabolomics and lipidomics analyses revealed metabolic signatures linked to mitochondrial dysfunction, altered fatty acid oxidation, and membrane lipid remodeling. Multivariate modeling demonstrated superior diagnostic performance compared with alpha-fetoprotein (AFP), including in AFP-negative cases.

To facilitate clinical translation, a rapid targeted HILIC–HRMS assay was developed on a quadrupole–Orbitrap system operating in multiplexed single-ion monitoring mode. Focusing on acylcarnitines and lysophosphatidylcholines, the method achieved high sensitivity, quantitative accuracy, and robustness, confirming the diagnostic relevance of the identified biomarkers.

Recognizing the growing need for high-sensitivity analyses from low-input samples, chromatographic miniaturization was further explored. A systematic comparison of conventional 2.1 mm i.d. and microbore 1.0 mm i.d. UHPLC configurations revealed substantial improvements in sensitivity, detection limits, repeatability, and metabolome coverage without compromising robustness or throughput. Finally, the principles of analytical miniaturization were extended to microdissected thyroid tumor tissues through a deep visual proteomics workflow, enabling deep molecular profiling from extremely limited sample material.

Collectively, this work establishes an integrated and sensitivity-driven multi-omics framework that combines chromatographic optimization, high-resolution mass spectrometry, targeted assay development, and workflow miniaturization. These advancements significantly expand metabolome coverage, improve analytical robustness, and support biomarker discovery and translational research in precision medicine.

Abstract

La rapida evoluzione delle scienze omiche sta trasformando profondamente la ricerca biomedica, accelerando il passaggio verso una medicina personalizzata e di precisione. Tra le discipline omiche, la metabolomica occupa un ruolo distintivo in quanto fornisce un'istantanea funzionale diretta dell'attività biochimica, integrando influenze genetiche, epigenetiche e ambientali. La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (LC-HRMS) è diventata il "gold standard" per la metabolomica e la lipidomica; tuttavia, ottenere una coverage completo del metaboloma rimane una sfida a causa della vasta diversità chimica e dell'ampio intervallo dinamico di concentrazione delle small molecules.

Questo progetto di dottorato si focalizza sullo sviluppo e l'ottimizzazione di strategie multi-omiche avanzate basate su LC-MS, progettate per migliorare le performance analitiche, aumentare il coverage del metaboloma e consentire il profiling di materiale biologico limitato. Durante la prima fase, sono stati sistematicamente ottimizzati i workflow in cromatografia a fase inversa (RP) e a interazione idrofilica (HILIC) per la metabolomica untargeted, utilizzando il plasma umano come matrice complessa di riferimento. È stato implementato un framework di valutazione basato sulla qualità dei picchi cromatografici per stimare la robustezza cromatografica, la riproducibilità e la qualità complessiva dei dati. L'uso combinato di approcci ortogonali RP e HILIC ha migliorato significativamente il coverage del metaboloma.

La piattaforma analitica ottimizzata è stata successivamente applicata a uno studio sul carcinoma epatocellulare in pazienti con infezione da virus dell'epatite C (HCV). Le analisi integrate di metabolomica e lipidomica untargeted hanno rivelato signature metaboliche correlate a: disfunzione mitocondriale, alterazione dell'ossidazione degli acidi grassi e rimodellamento dei lipidi di membrana. L'analisi multivariata ha dimostrato una performance diagnostica superiore rispetto all'alfa-fetoproteina (AFP), inclusi i casi AFP-negativi.

Per facilitare la traslazione clinica, è stato sviluppato un saggio HILIC-HRMS targeted rapido su un sistema quadrupolo-Orbitrap operante in modalità multiplexed single-ion monitoring. Focalizzandosi su acilcarnitine e lisofosfatidilcoline, il metodo ha raggiunto elevata sensibilità, accuratezza quantitativa e robustezza, confermando la rilevanza diagnostica dei biomarcatori identificati.

Riconoscendo la crescente necessità di analisi ad alta sensibilità da campioni esigui, è stato sviluppato e ottimizzato un approccio microbore (1.0 mm i.d.). Un confronto sistematico tra le configurazioni UHPLC convenzionali (2.1 mm i.d.) e microbore (1.0 mm i.d.) ha rivelato miglioramenti sostanziali nella sensibilità, nei limiti di rilevabilità e nel coverage del metaboloma, senza compromettere la robustezza o throughput. Infine, i principi della miniaturizzazione analitica sono stati estesi a tessuti tumorali tiroidei microdissezionati attraverso un workflow di Deep Visual Proteomics, consentendo una profilazione molecolare da materiale biotico estremamente limitato.

Insieme, questo lavoro stabilisce un framework multi-omico integrato e orientato alla sensibilità che combina ottimizzazione cromatografica, spettrometria di massa ad alta risoluzione, sviluppo di saggi mirati e miniaturizzazione. Questi progressi migliorano la robustezza analitica e supportano la scoperta di biomarcatori e la ricerca traslazionale nella medicina di precisione.