

ATOMÁRNÍ A MOLEKULÁRNÍ ZOBRAZOVACÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

**DOMINIKA LUPTÁKOVÁ a VLADIMÍR
HAVLÍČEK**

*Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20
Praha 4
vlhavlic@biomed.cas.cz*

Došlo 24.9.19, přijato 30.10.19.

Klíčová slova: zobrazovací hmotnostní spektrometrie, modalita, pixel, tkáň, řezy, distribuce

Hmotnostně-spektrometrické zobrazování, které se v anglosaské literatuře objevuje pod dvojím názvem „imaging mass spectrometry“ (IMS) nebo „mass spectrometry imaging“ (MSI), rozhodně není novou technikou. Ve variantě s ionizací SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) byla tato technika prezentována již v roce 1962 francouzskou dvojicí Slodzian-Castaing a použita k mapování kationtů na anorganických vzorcích¹. Klinický význam techniky si plně uvědomil až Richard Caprioli (Vanderbilt University, Nashville), který získal na konci devadesátých let americký patent pro použití MSI varianty s desorpceí a ionizací laserem za přítomnosti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) pro analýzu biologických vzorků². Ačkoli patent nespĺňuje podmínku novosti³, Caprioliho následné práce ukázaly dvě hlavní výhody techniky MSI: a) k zobrazování látek na biologických površích není třeba biomolekuly nijak značit a b) každý pixel může díky hmotnostnímu spektru obsahovat mnoho chemických informací⁴. U hmotnostního zobrazení jsou dvourozměrné obrazy povrchu získávány počítačovou rekonstrukcí jednotlivých signálů iontů vzniklých desorpceí ze zobrazovaného objektu⁵ či jejich kombinací⁶. Děje se tak většinou rastrovacím způsobem (microprobe mode), a to při laterálním rozlišení v řádu jednotek až desítek mikrometrů podle typu primárního ionizujícího svazku, kterým může být laser, svazek iontů (např. C_{60}^+), svazek nabitých kapiček, atd. V MALDI-MSI uspořádání se současné limity prostorového rozlišení pohybují v řádu 3–20 mikrometrů⁷. V posledních letech se rozmáhá i třírozměrné zobrazování a s ním spojený termín voxel⁸. Voxel je složeninou anglických slov volumetric (objemový) a element (prvek). Velmi zajímavými aplikacemi dneška jsou jednobuněčná analýza⁹ i retrospektivní analýza starých unikátních tkání stabilizovaných formalinem¹⁰.

Jistá dualita v používání zkratk IMS či MSI se odráží i v existenci dvou odborných společností, a to evropské Mass Spectrometry Imaging Society (<https://ms-imaging.org/wp/mass-spectrometry-imaging-society/>)

a americké Imaging Mass Spectrometry Society (<https://www.imagingmssociety.org/>). Na jejich webových stránkách lze nalézt řadu potřebných informací včetně současných komerčních konfigurací (např. <https://ms-imaging.org/wp/overview-of-commercial-instruments/>). Obě společnosti avšak organizují společnou konferenci Ourcon. V dalším textu se budeme držet zkratky MSI, i z důvodu používání podobného označení pro spektrometrii iontové mobility.

Jedno z těžišť současného biologického zobrazování tkví v identifikaci a charakterizaci biomarkerů na řezech tkání¹¹. Často se jedná o látky, které jsou v biologickém vzorku zastoupeny ve velmi nízkých koncentracích. Pokud to dovolí dynamický rozsah, je možné hodnotit nádorovou tkáň, případně subtypy tumorů na základě souboru bílkovin nebo jiných nízkomolekulárních specifických molekul, které jsou ve zdravých tkáních zastoupeny jinak. Je možné sledovat, do jakých orgánů se deponuje podané nízkomolekulární léčivo a jak je metabolizováno¹², respektive, jaká je molekulární odezva na příslušný léčebný proces. Obecně lze sledovat celou škálu molekul, co se týče molekulové hmotnosti nebo polarit. Prvotní technikou kombinovanou s MSI bylo uspořádání MALDI s analyzátozem doby letu (TOF, time of flight), od kterého se na počátku milénia očekávaly průlomové výsledky v zobrazování bílkovinných biomarkerů (tab. I), což však z důvodu omezeného dynamického rozsahu analyzátozu nebylo možné. Namísto toho se rozšířilo zobrazování nízkomolekulárních látek, zvláště snadno se ionizujících lipidů, a to v kombinaci s analyzátozem s dobrým dynamickým rozsahem a vysokým hmotnostním rozlišením. Při použití iontové cyklotronové rezonance nebo orbitální pasti lze detegovat i obtížně ionizovatelné molekuly, jako jsou metabolity, peptidy i malé bílkoviny¹³. Dynamickému rozsahu se pomáhá akumulací vybraných iontových intervalů předřazenými kvadrupoly či iontovými pastmi.

Příprava vzorku pro MALDI MSI může mít mnoho variant. Různé laboratoře si vyvíjejí vlastní specifické metody a používají další doprovodná zařízení (kryotomy, přístroje pro rychlé zahřátí tkání pro zastavení metabolických procesů, zařízení pro nanášení matrice). Jeden z obecných postupů je, že zmrazemá tkáň je v kryomikrotomu nařezána na tenké (12–20 μm) plátky, které se umístí na sklíčko pokovené vodivou vrstvou oxidů india a cínu (vodivost je důležitá pro účinné vkládání urychlovacího napětí). Vzorek je následně překryt vrstvou vybrané MALDI matrice. Nanášení technik je celá řada, společným požadavkem je definované a pomalé pokrývání maticí, aby docházelo k efektivní extrakci analytu a zamezilo se rozpouštění a disperzi zobrazovaných komponent v roztoku nanášené matrice, a tudíž i zhoršení laterálního rozlišení. Při práci s infekčními materiály lze vkládat jeden či více dezinfekčních kroků (zvýšená teplota, expozice

Tabulka I

Základní parametry MALDI, SIMS a LA-ICP hmotnostně spektrometrického zobrazování v kombinaci s různými hmotnostními analyzátoři

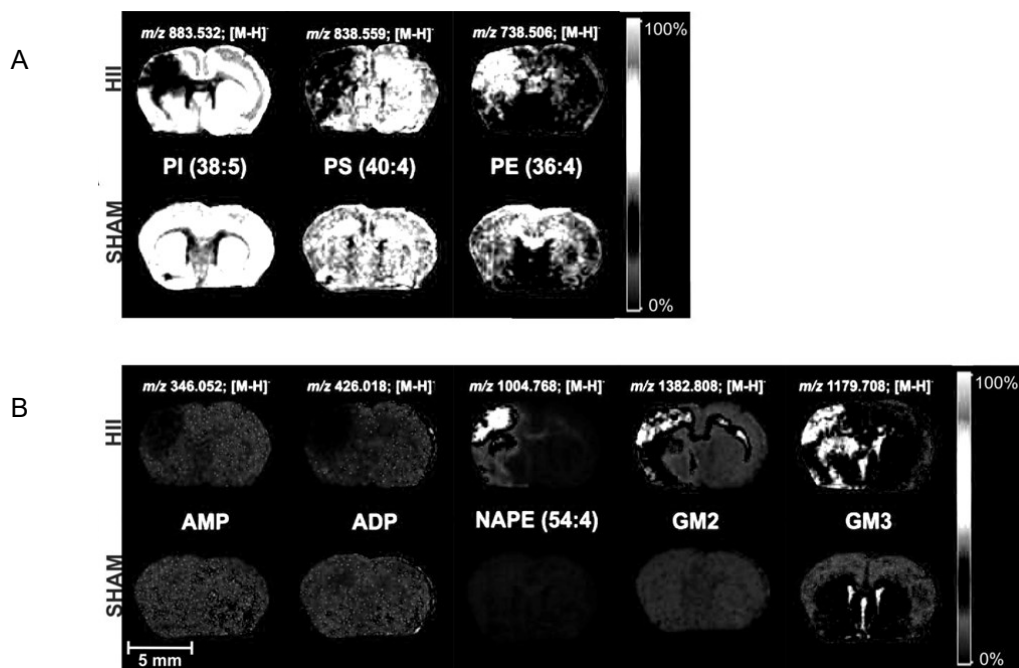
	MALDI-TOF	MALDI-FTICR	SIMS-TOF	LA-ICP-TOF
Incidenční svazek	laserový	laserový	keV ionty (klastry)	laserový
Hmotnostní rozsah, Th ^a	>100 000	<10 000	<2000	<200
Laterální rozlišení, μm	3–20	3–20	0,5–5	3–20
Hmotnostní rozlišení	20 000	1 000 000	20 000	20 000
Vzorkovací hloubka, μm	1	1	0,01	10
3D zobrazování	následné řezy	následné řezy	dynamické odprašování	následné řezy

^a Th – Thomson jednotka (Da/e) mimo SI a pravidla IUPAC

UV záření).

Po sběru dvojrozměrných dat lze získat z jediného řezu volitelný počet obrazů, které představují jednotlivé vizualizované m/z nebo jejich kombinace (obr. 1). Pomalé a rychle se vybíjející UV lasery (50 Hz, 100 milionů výstřelů) jsou nahrazovány Nd:YAG (aktivním materiálem je izotropní krystal Yttrium Aluminium Granátu dopovaný ionty neodymu) či jinými diodovými lasery s vyšší frekvencí (1–10 kHz) i životností ($>1 \cdot 10^9$ výstřelů). Se zvyšujícím se počtem pixelů a hmotnostním rozlišením se pro-

dluhuje doba sběru dat a roste velikost datových souborů, které mohou u přístrojů s Fourierovou transformací dosáhnout řádu desítek gigabytů. Následný export do standardizovaného zobrazovacího *imzML* datového formátu pak přináší i terabytové soubory. Je proto vhodné adekvátně volit laterální rozlišení v závislosti na povaze vzorku a typu požadované informace (sken řezu celým experimentálním zvířetem, detail v rámci orgánu, subcelulární analýza). Sběr dat trvá podle počtu pixelů, frekvence laseru, konstrukce iontového zdroje a rychlosti hmotnostního



Obr. 1. Rozložení významných biomarkerů hypoxicko-ischemického (HII) zásahu do mozku novorozeného potkana a porovnání s kontrolním vzorkem (SHAM). Technikou MALDI-MSI jsou popsány (A) fosfoinositoly (PI), fosfoseriny (PS), fosfoetanolaminy (PE) či (B) metabolické změny na úrovni adenosinofosfátů (AMP, ADP) a jiné typy lipidů (NAPE, GM2, GM3). Obrázek je převzat z doktorské disertační práce D. Luptákové.

analyzátoru a většinou se pohybuje v řádu minut či hodin.

V posledních letech byly pro zobrazovací účely otestovány různé ionizační techniky či jejich kombinace. Při použití druhé (tzv. post-ionizační) techniky může dojít k významným nárůstům iontových výtěžků. Komerční uplatnění nejdříve našly techniky MALDI, desorpčního elektrospreje (DESI) a laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP). Rovněž byly komercializovány laserová ablace kombinovaná s elektrosprejem (LAESI)⁶ a kapalný most (liquid bridge) s elektrosprejem (ESI) nebo nanoelektrosprejem. Experimentální aplikace jsou hlášeny v oblastech DAPPI (desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku), DAPCI (desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku) či NALDI (desorpce a ionizace laserem za přítomnosti nanostruktur)^{14–18}. Posledně jmenovaná technika je založena na prostém otisku tkáně na nanostrukturálním povrchu¹⁵. Oproti nejběžnějšímu MALDI zobrazení NALDI MSI pracuje bez matrice. Kombinací optimalizované úpravy obtisku (různé typy oplachů podle typu analyzovaných látek), absencí kationizovaných molekul a někdy i jednodušších fragmentačních spekter sledovaných analytů (odlišný obsah vnitřní energie v porovnání s MALDI) lze dosáhnout lepšího dynamického rozsahu a kontrastnějších zobrazení.

Při MSI lze jako post-ionizační techniku použít i druhý laser¹⁹. Při sběru dat jsou zachovány jak dobré laterální rozlišení díky primární laserové ablací, tak velmi slušná výtěžnost sekundárních iontů. Zisk v citlivosti může být v případě lipidů až dva řády, u jiných typů analytů nemusí být zlepšení citlivosti tak znatelné. Pro další charakterizaci, resp. kolizi indukovanou disociaci těchto iontů je důležité zmínit, že u MALDI MSI některé typy látek přednostně produkují kationizované molekuly, které lze jen obtížně disociovat. Post-ionizační krok (MALDI-2) v reionizačním procesu pak často nabídne tvorbu protonovaných molekul, se kterými se dále lépe pracuje v MS/MS režimu.

Tkáňová analýza není jedinou doménou zobrazovací hmotnostní spektrometrie, byť tato představuje hlavní aplikační oblast. V literatuře lze nalézt příklady zobrazování rostlin a jejich částí, vizualizaci živých objektů i řezů anorganických materiálů, složení mikrobiálních kolonií, distribuci léčiv v tabletách apod. Logickým trendem je prolnutí dat zobrazovací hmotnostní spektrometrie s jinými zobrazovacími technikami (multimodální zobrazování). Velký potenciál má MSI spojená s jadernou magnetickou rezonancí (MRI)²⁰, pozitronovou emisní tomografií (PET)²¹, skenovací elektronovou mikroskopií (SEM)²² i laserovou ablací (LA) a ionizací indukčně vázaným plazmatem (ICP)²³. Je třeba řešit nesourodé škálování (nanometrické rozlišení u SEM *versus* mikrometrické u MSI *versus* milime-

trové u PET) i vzájemnou kompatibilitu vyhodnocovacích programů. Standardem by mělo být srovnání spektrálních dat s histologickým hodnocením, které používá různé druhy specifického barvení (hematoxylin & eosin, barvení dle Nissla, Grocott-Gomori methenamin stříbro, atd.). K datové fúzi je možno použít volně dostupného programového vybavení²⁴.

Nejen při zobrazovacích experimentech by si každý uživatel měl předem uvědomit dynamický rozsah svého stanovení. Není možné vizualizovat komponenty, které jsou na řezu přítomny v koncentraci nižší, než je dynamický rozsah analyzátoru. Dalším faktorem je absolutní počet sekundárních iontů, které vzniknou během desorpčního a ionizačního procesu. Iontový výtěžek přímo závisí na velikosti pixelu a počtu molekul v něm obsažených (tab. II). Na úspěch zobrazovacího experimentu pak bude mít vliv především ionizační výtěžek a velikost proudové ztráty během cesty iontů k hmotnostnímu detektoru. Při SIMS-MSI analýze tudíž nebývá problém ani tak kolimace primárního iontového svazku, jako celkový iontový výtěžek. Dalším významným faktorem ovlivňujícím výtěžek sekundárních iontů je v SIMS instrumentaci volba primárního iontového svazku. Zatímco ionty Ga⁺, Au₃⁺ a Bi₃⁺ se při povrchové penetraci dostanou do větší hloubky při nižším sekundárním iontovém výtěžku, u primárních iontů SF₅⁺, C₆₀⁺ a Ar₁₀₀₀⁺ je tomu naopak. U polyatomárních primárních svazků sledujeme menší průnik primárního projektilu do analyzovaných vrstev, vysoký rozprašovací výtěžek a poškození pouze horních povrchových vrstev²⁵. Odlišné schopnosti desorbovat povrchové nebo podpovrchové vrstvy kombinací dvou typů primárních svazků lze využít pro 3D zobrazování.

Tab. II ilustruje situaci, kdy „méně“ molekul v oprašované ploše „neznamená více“ získaných iontů. Jinými slovy, „na velikosti“ kráteru (respektive počtu molekul v něm) získaných oprašením biologického povrchu velmi „záleží“ a závisí na něm úspěch celého zobrazovacího experimentu. Další zjednodušení, které tab. II nebere v úvahu, je skutečnost, že biologické povrchy nejsou rovné a pokud je primární laserový svazek veden na biologický povrch ze strany (a často i z velké vzdálenosti), dochází k výrazným transmisním ztrátám. Pro zlepšení celkové bilance současná moderní řešení zahrnují například použití koaxiální optiky primárního laserového svazku^{26,27}. Při odsávání desorbovaných iontů iontovou optikou, která je umístěna v těsné blízkosti ionizačního místa, pak lze dosáhnout daleko nižších proudových ztrát i lepších výsledků v kvantitativních stanoveních. Řešení vyvinula skupina Bernharda Spenglera (Giessen, Německo)

Tabulka II

Množství sekundárních iontů generovaných při iontovém výtěžku 10⁻⁵ (*) v závislosti na šířce primárního svazku

Velikost pixelu	Plocha pixelu [cm ²]	Počet molekul v pixelu	Počet sekundárních iontů z pixelu (*)
10 × 10 μm	10 ⁻⁶	10 ⁸	1000
1 × 1 μm	10 ⁻⁸	10 ⁶	10
100 × 100 nm	10 ⁻¹⁰	10 ⁴	0,1

a dosáhla laterálního rozlišení lepšího než 2 μm .

Další zajímavou aplikací je kombinace hmotnostní spektrometrie s mikroskopií atomárních sil (atomic force microscopy, AFM). Skupina Olgy Ovchinnikovové (Oak Ridge, USA) využívá AFM hrot k rastrování biologického povrchu. Při „ponoření“ do měřeného materiálu (do hloubky cca 50 nm) je na hrot nanášeno dostatečné množství látek, které lze následným laserovým svazkem termálně uvolnit a vhodným vzorkovacím zařízením odvézt do iontového zdroje hmotnostního spektrometru^{28,29}. Ačkoli první experimentální data byla prezentována na snadno ionizovatelných látkách, právě kombinace AFM-MSI se do budoucna může stát další MSI technikou se submikronovým rozlišením a najít svoje aplikace v biologii (subcelulární analýza) či materiálových vědách.

Práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LO1509) a Grantovou agenturou České republiky (19-10907S).

LITERATURA

1. Castaing R., Slodzian G.: C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 255, 1893 (1962).
2. Caprioli R. M.: U.S. (1998), US 5808300 A 19980915.
3. Spengler B., Hubert M., Kaufmann R.: *Proceedings of the 42nd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, May 29 - June 3, 1994*. str. 1041, Chicago, Illinois 1994.
4. Vidová V., Volný M., Lemr K., Havlíček V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 74, 1101 (2009).
5. Pól J., Strohalm M., Havlíček V., Volný M.: Histochem. Cell Biol. 134, 423 (2010).
6. Ellis S. R., Soltwisch J., Paine M. R. L., Dreisewerd K., Heeren R. M. A.: Chem. Commun. 53, 7246 (2017).
7. Deutskens F., Yang J. H., Caprioli R. M.: J. Mass Spectrom. 46, 568 (2011).
8. Dreisewerd K., Yew J. Y.: Nat. Methods 14, 1139 (2017).
9. Schober Y., Guenther S., Spengler B., Rompp A.: Anal. Chem. 84, 6293 (2012).
10. Casadonte R., Caprioli R. M.: Nat. Protoc. 6, 1695 (2011).
11. Balluff B., Schone C., Hofler H., Walch A.: Histochem. Cell Biol. 136, 227 (2011).
12. Greer T., Sturm R., Li L. J.: J. Proteomics 74, 2617 (2011).
13. Cassat J. E. a 17 spoluautorů: Sci. Transl. Med. 10, eaan6361 (2018).
14. Pól J., Vidová V., Kruppa G., Kobliha V., Novák P., Lemr K., Kotiaho T., Kostianen R., Havlíček V., Volný M.: Anal. Chem. 81, 8479 (2009).
15. Vidová V., Novák P., Strohalm M., Pól J., Havlíček V., Volný M.: Anal. Chem. 82, 4994 (2010).
16. Vidová V., Pól J., Volný M., Novák P., Havlíček V., Wiedmer S. K., Holopainen J. M.: J. Lipid Res. 51, 2295 (2010).
17. Pól J., Vidová V., Hyotylainen T., Volný M., Novák P., Strohalm M., Kostianen R., Havlíček V., Wiedmer S. K., Holopainen J. M.: PLoS One 6, e19441 (2011).
18. Strohalm M., Strohalm J., Kaftan F., Krásný L., Volný M., Novák P., Ulbrich K., Havlíček V.: Anal. Chem. 83, 5458 (2011).
19. Niehaus M., Soltwisch J., Belov M. E., Dreisewerd K.: Nat. Methods 16, 925 (2019).
20. Luptáková D., Bačiak L., Pluháček T., Škríba A., Šedivá B., Havlíček V., Juránek I.: Sci. Rep. 8, 6952 (2018).
21. Luptáková D., Pluháček T., Petřík M., Novák J., Palyzová A., Sokolová L., Škríba A., Šedivá B., Lemr K., Havlíček V.: Sci. Rep. 7, 16523 (2017).
22. Novák J., Sokolová L., Lemr K., Pluháček T., Palyzová A., Havlíček V.: Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics 1865, 768 (2017).
23. Škríba A., Pluháček T., Palyzová A., Nový Z., Lemr K., Hajdúch M., Petřík M., Havlíček V.: Front. Microbiol. 9, 2356 (2018).
24. Novák J., Škríba A., Zápál J., Kuzma M., Havlíček V.: J. Mass Spectrom. 53, 1097 (2018).
25. Postawa Z., Czerwinski B., Szewczyk M., Smiley E. J., Winograd N., Garrison B. J.: J. Phys. Chem. B 108, 7831 (2004).
26. Kompauer M., Heiles S., Spengler B.: Nat. Methods 14, 90 (2017).
27. Kompauer M., Heiles S., Spengler B.: Nat. Methods 14, 1156 (2017).
28. Ievlev A. V., Brown C., Burch M. J., Agar J. C., Velarde G. A., Martin L. W., Maksymovych P., Kalinin S. V., Ovchinnikova O. S.: Anal. Chem. 90, 3475 (2018).
29. Somnath S., Jesse S., Van Berkel G. J., Kalinin S. V., Ovchinnikova O. S.: Nanoscale 9, 5708 (2017).

D. Luptáková and V. Havlíček (*Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague*): **Atomic and Molecular Mass Spectrometry Imaging**

This review article summarizes the practical aspects of contemporary mass spectrometry imaging (MSI). Although the number of MSI academic installations in the Czech Republic is less than ten, we expect a substantial spreading into further basic or applied research areas. At present, most of mass spectrometry vendors offer MSI packages, and we hope that in future this technique will be as common as optical microscopy. Visualization of components without any labelling represents a significant advantage. On the other hand, the condition of a sufficient analytical dynamic range and ionization efficiencies of visualized components should be fulfilled in any successful experiment.

Keywords: mass spectrometry imaging, modality, pixel, tissue, sections, distribution

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LO1509), and the Czech Science Foundation (19-10907S).