

Hmotnostní spektrometrie intaktních tkání a její využití v diagnostice

Vacek J.

Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Brno

SOUHRN

V tomto krátkém sdělení je popsána nová metoda hmotnostní spektrometrie (MS) s desorpční elektrosprej ionizací (DESI). Tato technika umožňuje vysoce selektivní analýzy nádorových markerů ve vzorcích intaktní tkáně. Pomocí DESI-MS je možné analyzovat distribuci markerů v histopatologických nálezech a provádět analýzy bez předchozí úpravy vzorku. DESI je kombinací klasické ionizace elektrosprejem a desorpční ionizační techniky, které se v hmotnostní spektrometrii běžně využívají. Předpokládá se, že DESI-MS nalezne uplatnění v molekulární medicíně a v *in vivo* diagnostice.

Klíčová slova: markery, diagnostika, hmotnostní spektrometrie, desorpční elektrosprej ionizace.

SUMMARY

Vacek J.: Mass spectrometry of intact tissue and its application in diagnostics

In this paper the new mass spectrometry (MS) method with electrospray desorption ionization (DESI) is described. The method allows selective analysis of tumour markers in intact tissue samples. By DESI-MS the analysis of marker distribution (mass spectrometry imaging) in tissue sample without complicated sample pretreatment can be realised. DESI is a combination of electrospray and desorption ionization technique which are currently used in MS analysis. We can expect that DESI-MS will be useful analytical tool in molecular medicine and *in vivo* diagnostics.

Key words: disease markers, diagnostics, mass spectrometry, desorption electrospray ionization.

Úvod

Hmotnostní spektrometrie (MS) je instrumentální analytická metoda, která se využívá k analýzám širokého spektra biologicky významných látek [1]. V klinické praxi se MS často aplikuje v kombinaci s technologií čipů a nanotechnologií k detekci DNA, mRNA, proteinů a farmakochemických preparátů. Vzhledem k vysoké selektivitě této metody je možné využít MS v diagnostice, respektive k identifikaci markerů závažných onemocnění [2].

Konstrukčních typů hmotnostních spektrometrů je mnoho. Klasická konstrukce je založena na přivedení kapalného vzorku do iontového zdroje. V iontovém zdroji vznikají molekulární ionty a jejich fragmenty a ty putují do analyzátoru a dále jsou rozděleny (selektovány) podle jejich hmotnosti a náboje (m/z). Selektované ionty jsou detegovány, přičemž každá látka je identifikována na základě několika iontů s různými hodnotami m/z [3].

Ionizační techniky

V klinické biochemii se používá ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizační technika laserové desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI). Při ionizaci elektrosprejem prochází vzorek kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3–5 kV).

Zde dochází ke zmlžení vzorku a vzniku malých kladně nebo záporně nabitých kapiček a uvolnění protonovaných, respektive deprotonovaných molekulárních iontů a fragmentů putujících do analyzátoru [4].

V případě ionizační techniky MALDI je vzorek smíchán s matricí a nanesen na terčík nebo nanesen na terčík pokrytý vrstvičkou matrice. Vzorek je společně s matricí vystaven krátkému laserovému pulzu. Molekuly se odpaří a matrice se podílí na ionizaci vzorku. Vzniklé molekulární ionty a fragmenty putují, stejně jako u ESI, do analyzátoru [5]. Mezi nejběžněji používanými patří analyzátor: iontová past, kvadrupolový a nebo průletový (TOF: time-of-flight) analyzátor [1, 4, 6, 7].

Hmotnostní spektrometrie intaktních tkání

Pro výše popsané MS analýzy je potřebné vzorek buněk nebo tkáně homogenizovat a podrobit poměrně komplikované přípravě. Výrazným krokem kupředu v aplikovatelnosti MS technologie v klinické praxi byl objev nové ionizační techniky, která je schopna provádět vysoce selektivní analýzy v intaktním vzorku tkáně. Technika byla označena jako desorpční elektrosprej ionizace (DESI) [8] a je založena na kombinaci klasické ionizační (např. ESI) a desorpční (např. MALDI) techniky.

Vzorek je vystaven ionizovanému spreji, který desorbuje ionty z jeho povrchu [9]. V elektrospreji dochází k ionizaci vodného roztoku organické kyseliny nebo hydroxidu napětím několika kilovoltů (např. 5 kV, viz publikace [8]). Desorbované ionty jsou následně přiváděny do hmotnostního spektrometru, respektive analyzátoru, kterým je iontová past. Kapilárou spreje je možné snímat celou plochu vzorku a získat 2-D distribuci sledovaného markeru v histopatologickém nálezu (mass spectrometry imaging) [10]. Schéma DESI-MS je ukázáno na obrázku 1a.

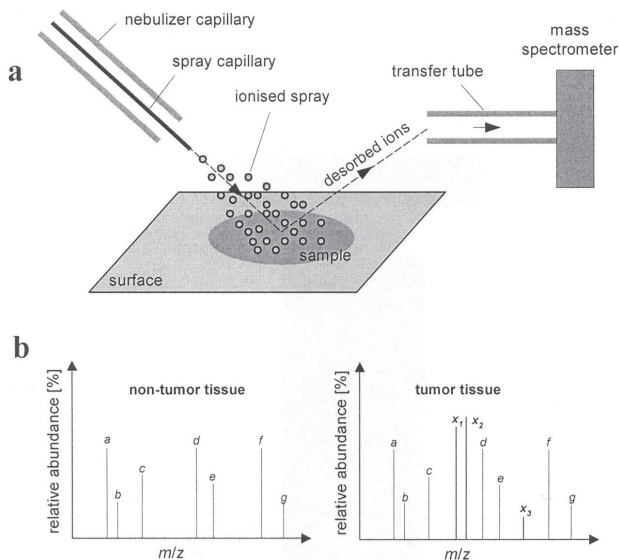


Fig. 1. a) Desorption electrospray ionization-mass spectrometry. The sample was deposited onto a surface, and ionized solution (water/organic acid) was sprayed. Desorbed ions were directed to the mass spectrometer via the transfer tube; adapted from [8,10]. b) MS-spectrum of non-tumor (left) and tumor tissue (right). In MS-spectrum of tumor tissue are present specific x_1 , x_2 and x_3 abundance peaks of tumor marker.

Využití DESI-MS pro stanovení diagnózy *in vivo*

DESI-MS byla s úspěchem použita k analýzám spektra fosfolipidů, které indikují maligní transformaci, v 16 μm řezech mozkové tkáně krys, myšičího pankreatu a lidské tkáně jaterního adenokarcinomu [7]. Výše uvedeným postupem je možné metodou DESI-MS zaznamenat hmotnostní spektra zdravé a nádorové tkáně. Vzorky byly získány zmrazením tkáně kapalným dusíkem a provedením řezů na mikrotomu. V hmotnostním spektru zdravé tkáně lze pozorovat sérii abundancí (početností) s typickými m/z hodnotami (viz schematicky na obr. 1b – vlevo; píky a–g). Naproti tomu u tkáně, ve které probíhá maligní transformace, lze pozorovat abundance iontů: x_1 , x_2 , x_3 . Ty odpovídají přítomnosti nádorového markeru ve tkáni (obr. 1b – vpravo).

V případě práce Wisemana et al. [7] se jednalo o ionty s m/z hodnotami 703, 725 a 741, které odpovídají sfingomyelinu (a jeho sodnému a draselnému aduktu), a molekulární ionty a fragmenty vybraných fosfolipidů. Změny koncentrace sfingomyelinu jsou spojovány s angiogenezí u proliferaujících nádorových buněk. Také změny ve spektru dalších fosfolipidů poukazují na nádorovou transformaci. DESI a její spojení s hmotnostní spektrometrií bylo publikováno v roce 2004. Technika je s úspěchem aplikována pro analýzy nízkomolekulárních nepolárních látek, alkaloidů, metabolitů a léčiv [7, 10]. Metodu DESI-MS je možné využít i pro stanovení biopolymerů (cukrů, proteinů a nukleových kyselin). Již současné analýzy potvrzují, že DESI-MS je reálně využitelná k *in vivo* analýzám. Tento přístup byl uplatněn u pacienta po perorální aplikaci antihistaminika – Loratadinu. Po 50 minutách byl Loratadin prokázán hmotnostní spektrometrií v pokožce prstu pacienta [8, 9].

Závěr

Metoda DESI-MS by mohla být v budoucnu využita přímo v průběhu operačního výkonu k *in vivo* analýze nádorové tkáně nebo při diagnostice kožního onemocnění. Své uplatnění nalézá DESI-MS i v případě sledování kvality léčiv. Autoři recentní práce [11] aplikovali metodu DESI-MS/MS pro přímé stanovení 22 komerčně dostupných preparátů (ve formě tablet a prášku, bez přípravy vzorku k analýze). Analýza jedné tablety trvá asi 10 sekund. Dá se předpokládat, že tento nový analytický nástroj nalezne široké uplatnění v diagnostice, molekulární medicíně a obecně v klinické biochemii.

Literatura

1. Honour, J. W. Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem.*, 2003, 40, p. 628–638.
2. Vacek, J. Proteinové čipy v moderní klinické biochemii. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14, s. 25–30.
3. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. Druhé vydání. Nakladatelství Pavel Klouda : Ostrava 2003, s. 132, ISBN: 80-86369-07-2.
4. Holčapek, M., Jandera, P. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chem. Listy*, 1998, 92, s. 278–286.
5. Bakhtiar, R., Nelson, R. W. Electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry – Emerging technologies in biomedical sciences. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, 59, p. 891–905.
6. Verner, P. Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze. *Chem. Listy*, 2005, 99, s. 937–942.
7. Wiseman, J. M., Puolitaival, S. M., Takats, Z., Cooks, R. G., Caprioli, R. M. Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2005, 44, p. 7094–7097.
8. Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., Cooks, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 2004, 306, p. 471–473.
9. Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., Cooks, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. Supporting Online Material (October 2004): <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/306/5695/471/DC1>.
10. Koch, G. D. Mass spectrometric technique allows tissue analysis in ambient conditions. *Biophotonics Int.*, 2006, 13, p. 28–30.
11. Leuthold, L. A., Mandscheff, J. F., Fathi, M. et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: direct toxicological screening and analysis of illicit Ecstasy tablets. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, 20, p. 103–110.

Do redakce došlo 10. 3. 2006.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Jan Vacek

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie

Biofyzikální ústav AV/ČR

Královopolská 135

612 65 Brno

e-mail: jan.vacek@ibp.cz