

In-vivo- und In-situ-Gewebeanalyse mithilfe von Ionisationsmassenspektrometrie durch schnelle Verdampfung**

Karl-Christian Schäfer, Júlia Dénes, Katalin Albrecht, Tamás Szaniszló, Júlia Balog, Réka Skoumal, Mária Katona, Miklós Tóth, Lajos Balogh und Zoltán Takáts*

Die Massenspektrometrie (MS) wird schon seit über drei Dekaden dazu verwendet, intaktes biologisches Gewebe zu untersuchen, allerdings brachte diese Methode immer auch starke Einschränkungen hinsichtlich der Gestalt und der Präparation der untersuchten Gewebeproben mit sich. Auch die jüngsten Fortschritte bei der Ionisation unter Umgebungsbedingungen konnten nicht alle diese Einschränkungen überwinden.^[1–5]

MS-Untersuchungen von Biomolekülen in Gewebe werden traditionell mit Desorption/ionisation (DI)-Methoden durchgeführt, darunter Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS),^[6–11] Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)^[12–17,19,20] oder Desorption-Elektrospray-Ionisation (DESI).^[4,5,18]

Während DI-Methoden nicht für die Analyse von lebendem Gewebe geeignet sind, eröffnet sich durch die Anwendung schneller thermischer Verdampfung die Möglichkeit einer In-situ- und In-vivo-Ionisation von Gewebekomponenten. Die Möglichkeit, organische Ionen aus einer festen Phase durch einen rein thermischen Prozess zu erzeugen, wurde zuerst von Holland et al.^[21] vorgeschlagen und später erfolgreich demonstriert.^[22–24] Ein schnelles Aufheizen ist erforderlich, um Verdampfungsgeschwindigkeiten von Molekülen zu erzielen, die ähnlich groß wie deren Zersetzungsgeschwindigkeiten sind, was die Bildung einer größeren Menge gasförmiger Moleküle oder Molekülionen zur Folge hat.

Die Suche nach einer effizienten thermischen Verdampfung führte zur Entwicklung verschiedener thermisch unterstützter Ionisationsmethoden, unter anderen der Thermo-spray-Ionisation.^[25] Da eine Kollisionskühlung bei höherem Druck effektiver ist, ist bei einer thermischen Verdampfung

unter Atmosphärendruck eine Verminderung der thermischen Zersetzung zu erwarten. Thermische Desorption und Ionisation unter Atmosphärendruck konnten jüngst durch die Desorption organischer Kationen bei minimaler thermischer Zersetzung demonstriert werden.^[26,27]

Die vorliegende Arbeit gründet auf der Entdeckung, dass die schnelle thermische Verdampfung von biologischem Gewebe zur Freisetzung von Molekülionen von Gewebekomponenten, z.B. Phospholipiden, führt. Da thermische Verdampfung von Gewebe in der Chirurgie weit verbreitet ist (z.B. Elektro- und Laserchirurgie), ist es sinnvoll, solche chirurgischen Instrumente für die Experimente zu verwenden. Zudem eröffnet die Kombination chirurgischer und massenspektrometrischer Techniken die Möglichkeit von chemischen In-situ-Untersuchungen während einer Operation. Da das wesentliche Merkmal dieser massenspektrometrischen Methode die schnelle Verdampfung der Probe ist, wurde die Technik „Ionisationsmassenspektrometrie durch schnelle Verdampfung“ (Rapid Evaporative Ionisation Mass Spectrometry, REIMS) genannt. Ein vorläufiger Mechanismus für die Ionenbildung wird in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Die elektrochirurgische Sektion basiert auf der Jouleschen Eigenheizung und dem Verdampfen von Gewebe durch elektrischen Strom. Die Gegenwart ionisierter Wassermoleküle während des Prozesses erhöht die Möglichkeit des Auftretens alternativer Ionisationsmechanismen, wie etwa einer neutralen Desorption und chemischen Gasphasenionisation. Weitere Details finden sich in den Hintergrundinformationen. Eine Elektrochirurgieelektrode wird als Ionenquelle verwendet und mit einem entfernten Massenspektrometer unter Verwendung einer Venturi-Pumpe und einem 1–2 m langem Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schlauch^[28] verbunden (Abbildung 1).

Die mit REIMS erhaltenen Massenspektren (Abbildung 2) zeigen für beide Polaritäten hauptsächlich Ionen zwischen $m/z = 600$ und 1000 . Die Signale wurden durch genaue Massenbestimmung und MS/MS-Analysen als Glycerophospholipide oder deren thermische Abbauprodukte identifiziert. Die Tatsache, dass Phospholipidionen die Spektren dominieren, wird vorläufig mit ihrer großen Menge in Gewebe, ihrem ionischen Charakter unter physiologischen Bedingungen und ihrer geringen Desolvatisierungs(Dehydratisierungs)-Enthalpie erklärt (siehe Hintergrundinformationen). In Tabelle 1 sind die identifizierten Lipide zusammengestellt.

Unterschiedliche Gewebetypen zeigen charakteristische Unterschiede in den Spektren, weshalb ein System zur Gewebeerkenntnis unter Verwendung einer Spektrendaten-

[*] K.-C. Schäfer, Dr. Z. Takáts
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Justus-Liebig-Universität
Schubertstraße 60, Haus 16, 35392 Gießen (Deutschland)
Fax: (+49) 641-9934-809
E-Mail: zoltan.takats@anorg.chemie.uni-giessen.de

K. Albrecht, T. Szaniszló, J. Balog
Massprom Ltd., Rétköz u. 1, 1118 Budapest (Ungarn)
J. Dénes, Dr. R. Skoumal, M. Katona, Dr. M. Tóth, Dr. Z. Takáts
Semenov Institute of Chemistry, Ulloiu ut 26, 1083 Budapest (Ungarn)
L. Balogh
„Frédéric Joliot-Curie“ National Research Institute for Radiobiology
and Radiohygiene, Anna u. 5, 1221 Budapest (Ungarn)

[**] Diese Arbeit wurde vom Hungarian National Office for Research and Technology (Nanodrug Grant) und dem European Research Council (ERC-STG 210356) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902546> zu finden.

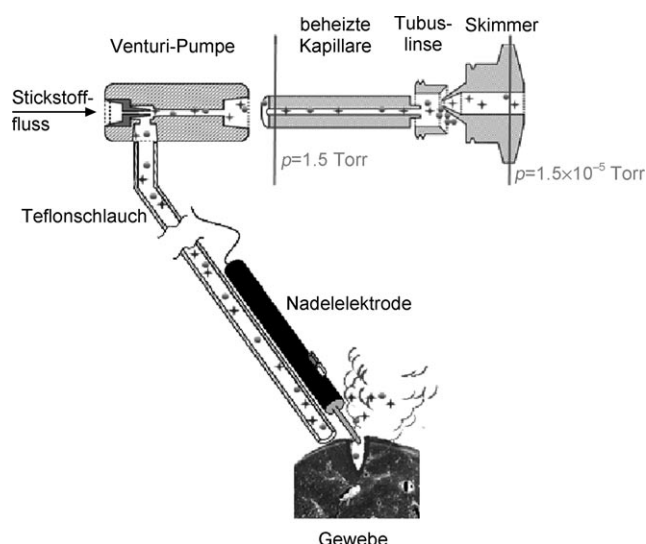


Abbildung 1. Experimenteller Aufbau für die Gewebeanalyse mit REIMS. Gewebe verdampft an der Kontaktfläche zur chirurgischen Elektrode. Die Ionen werden mit einer Venturi-Pumpe ins Massenspektrometer transferiert. Positive und negative Ionen werden zugleich produziert und durch die Polarität in der Tubuslinse-Skimmer-Region voneinander getrennt. Punkte symbolisieren neutrale, Sterne geladene Partikel.

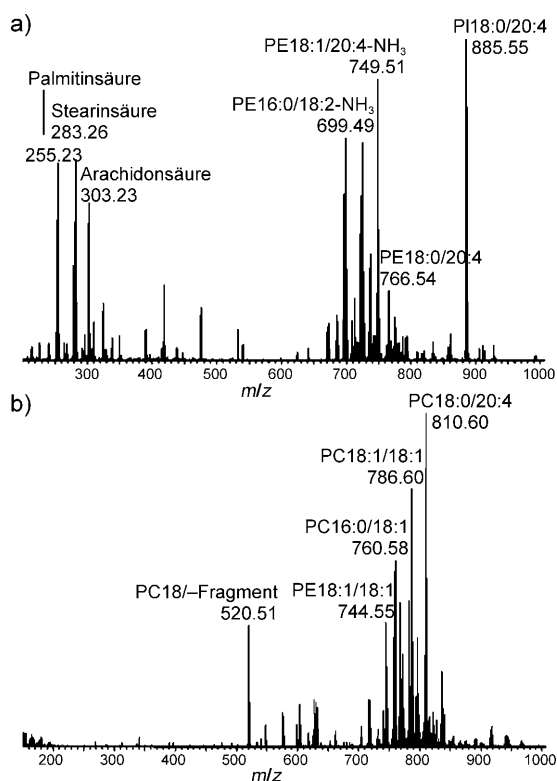


Abbildung 2. REIMS-Spektren von lebendem Schweinelebergewebe im a) Negativ- und b) Positivionenmodus. Signale wurden durch genaue Massenbestimmung zugeordnet. Siehe Tabelle 1.

bank und einer Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) entwickelt wurde. Alternativ wurde auch ein Gewebeidentifikationsalgorithmus entwickelt (Details siehe Hintergrundinformationen.) Die Datenpunkte, die

Tabelle 1: Identifizierte Lipide und Abbauprodukte in positiven und negativen REIMS-Spektren von lebendem Schweinelebergewebe (MS-Daten für Identifikation siehe Hintergrundinformationen; Zahl der C-Atome:Zahl der Doppelbindungen).

Verbindung	Fettsäuren
Positivionenmodus	
Phosphatidylcholine (PC)	16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3, 22:6
Phosphatidylethanolamine (PE)	14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3, 22:6
Sphingomyeline (SM)	18:0, 18:1, 20:4, 22:6
Triglyceride (NH ₄ ⁺ -Addukte)	16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3, 22:6
Negativionenmodus	
Fettsäuren	2:0, 3:0, 4:0, 8:0, 8:1, 10:0, 10:1, 12:0, 12:1, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:2, 20:3, 20:4, 22:6
Phosphatidylethanolamine (PE)	14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3, 22:6
Phosphatidylethanolamine-NH ₃ (PE-NH ₃)	identisch zu PE
Phosphatidylserine	16:0, 18:1, 18:0
Phosphatidylinositol (PI)	16:0, 18:0, 20:4
Sulfatide	16:0, 18:1, 20:4
Plasmalogene	16:0, 18:1
Phosphorsäuren	16:0, 18:1, 18:0

beim Schneiden einer Schweineleiere erhalten wurden, wurden mit der PCA analysiert und in Abhängigkeit von den ersten beiden PCA-Parametern aufgetragen. Spektren von Cortex, Medulla und Pelvis sind deutlich voneinander getrennt (Abbildung 3). Da die Gewebeanalyse mit REIMS im Zeitraum von 0.1 bis 0.3 s erfolgt und die Datenanalyse nur 0.1 bis 0.15 s benötigt, verspricht das System virtuelle Echtzeitinformationen über die Natur des seziierten Gewebes.

Die In-situ-Echtzeitgewebeidentifikation ist vielversprechend für die Anwendung in der Krebschirurgie. Krebszellen weisen im Vergleich zu normalen Zellen eine veränderte Phospholipidzusammensetzung auf.^[29–31] Die in-situ Identifikation von bösartigen Tumoren wurde an einem Hundemelanom getestet. Im Vergleich zwischen dem Melanom, dem gesunden Epithelgewebe und dem befallenen Lymphknoten (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S4) zeigen die Spektren des primären Tumors und der Metastasen große Ähnlichkeit, während sich beide deutlich vom gesunden Epithelgewebe unterscheiden. REIMS-Untersuchungen enthüllen aber nicht nur die Gegenwart von bösartigem Tumorgewebe, sondern liefern auch Informationen über den Grad und die mögliche Nekrose des Tumors, wie in Abbildung 4 gezeigt.

Die hier vorgestellten Befunde liefern die Grundlage für die weitere Entwicklung von massenspektrometrisch unterstützten chirurgischen Methoden. REIMS ermöglicht die schnelle Analyse von lebendem und behandeltem Gewebe und die Echtzeitidentifikation von Gewebeeigenschaften während eines chirurgischen Eingriffs. Die Anwendung der Methode zur Lokalisierung von bösartigem Gewebe (einschließlich Metastasen) während einer Tumoresektion konnte demonstriert werden. Da alle In-vivo-Experimente

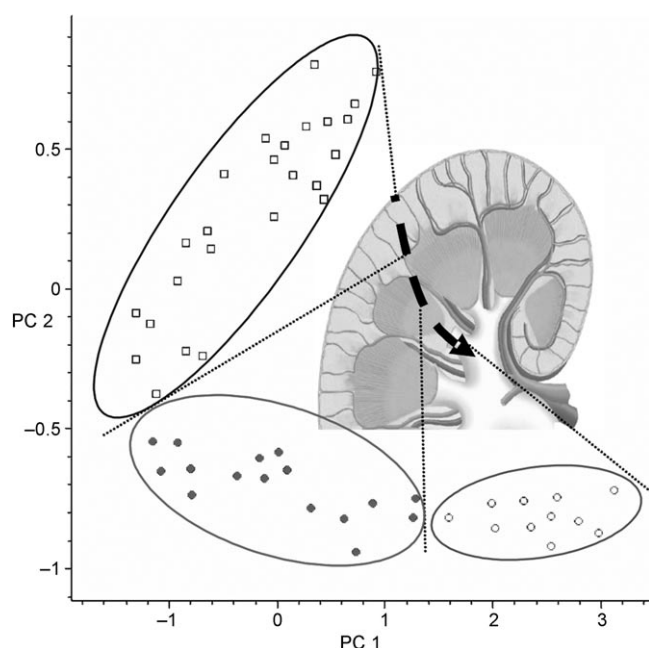


Abbildung 3. Zweidimensionale PCA-Auftragung der REIMS-Spektren aus einer Schweineiere. Der Pfeil zeigt den Schnittverlauf; Spektren wurden kontinuierlich aufgenommen. □: Cortex, ●: Medulla, ○: Pelvis.

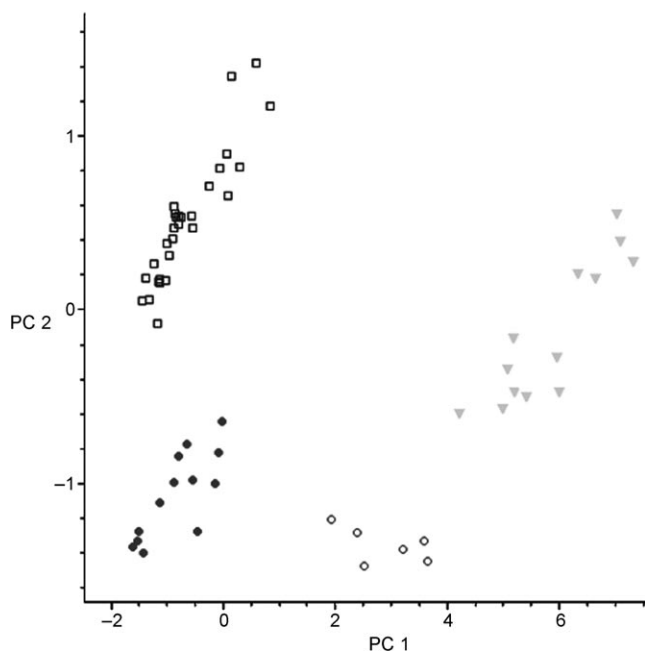


Abbildung 4. Zweidimensionale PCA-Auftragung der REIMS-Spektren von gesundem und tumorösem Brustgewebe. □: In-situ-Karzinom im Anfangsstadium, ●: Mastzellentumor (Grad II–III), ○: nekrotisches Mastzellentumorgewebe, ▼: gesundes Gewebe.

mit zugelassenen Instrumenten (mit Ausnahme der MS-Analyse) und in der benötigten Umgebung durchgeführt wurden, kann die Methode direkt in Operationssälen zur Anwendung gebracht werden.

Experimentelles

Eine kommerzielle Elektrochirurgieeinheit (ICC 300, Erbe Elektromedizin GmbH) wurde für die Ionisation und die Gewebeschnitte in Cutting Mode 4 verwendet. Die maximale Schnittleistung wurde auf 80 W begrenzt. Das Elektrochirurgiehandstück wurde mit einer Abgasleitung (Erbe) ausgestattet. Die Leitung wurde mit einer VAC-100-Venturi-Pumpe (Veriflo, Parker Instruments) über einen 1/8"-AD-2-mm-ID-PTFE-Schlauch verbunden. Die Venturi-Pumpe wurde mit einem Gasfluss von 20 L min⁻¹ betrieben. Der Auslass der Venturi-Pumpe wurde auf die Atmosphärenschnittstelle des Massenspektrometers gerichtet. Für die hochaufgelösten Messungen wurde ein Thermo-LTQ-Orbitrap-Discovery-Massenspektrometer verwendet, während ein Thermo-LCQ-Deca-XP-Instrument für die In-vivo-Experimente zum Einsatz kam.

Eingegangen am 13. Mai 2009,
veränderte Fassung am 8. August 2009
Online veröffentlicht am 10. September 2009

Stichwörter: Biomarker · Krebsdiagnose ·
Massenspektrometrie · Phospholipide · Gewebeanalyse

- [1] R. B. Cody, J. A. Laramee, H. D. Durst, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2297.
- [2] R. G. Cooks, Z. Ouyang, Z. Takats, J. M. Wiseman, *Science* **2006**, *311*, 1566.
- [3] J. Shiea, M. Z. Huang, H. J. HSu, C. Y. Lee, C. H. Yuan, I. Beech, J. Sunner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 3701.
- [4] Z. Takats, J. M. Wiseman, R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 1261.
- [5] Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks, *Science* **2004**, *306*, 471.
- [6] Y. Magnusson, P. Friberg, P. Sjövall, F. Dangardt, P. Malmberg, Y. Chen, *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **2008**, *28*, 202.
- [7] P. Sjövall, J. Lausmaa, B. Johansson, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4271.
- [8] T. L. Colliver, C. L. Brummel, M. L. Pacholski, F. D. Swanek, A. G. Ewing, N. Winograd, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2225.
- [9] M. L. Kraft, P. K. Weber, M. L. Longo, I. D. Hutcheon, S. G. Boxer, *Science* **2006**, *313*, 1948.
- [10] D. Touboul, F. Halgand, A. Brunelle, R. Kersting, E. Tallarek, B. Hagenhoff, O. Laprevote, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1550.
- [11] A. Benninghoven, W. K. Sichter, *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1180.
- [12] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299.
- [13] D. S. Cornett, S. L. Frappier, R. M. Caprioli, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5648.
- [14] T. C. Rohner, D. Staab, M. Stoeckli, *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 177.
- [15] S. S. Rubakhin, J. C. Jurchen, E. B. Monroe, J. V. Sweedler, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 823.
- [16] M. Stoeckli, D. Staab, A. Schweitzer, J. Gardiner, D. Seebach, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1921.
- [17] M. Wisztorski, R. Lemaire, J. Stauber, S. A. Menguelet, D. Croix, O. J. Mathe, R. Day, M. Salz, I. Fournier, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3317.
- [18] J. M. Wiseman, S. M. Puolitaival, Z. Takats, R. G. Cooks, R. M. Caprioli, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7256; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7094.
- [19] J. Schiller, R. Suss, J. Arnhold, B. Fuchs, J. Lessig, M. Müller, M. Petkovic, H. Spalteholz, O. Zschornig, K. Arnold, *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 449.
- [20] M. Rujoi, R. Estrada, M. C. Yappert, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1657.
- [21] J. F. Holland, B. Soltmann, C. C. Sweeley, *Biomed. Mass Spectrom.* **1976**, *3*, 340.

- [22] J. S. Gaffney, R. C. Pierce, L. Friedman, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 4293.
 - [23] R. Stoll, F. W. Röhlgen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 789.
 - [24] R. J. Cotter, A. L. Yergey, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 1596.
 - [25] C. R. Blakley, J. J. Carmody, M. I. Vestal, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5931.
 - [26] Z. Takáts, R. G. Cooks, *Chem. Commun.* **2004**, 444.
 - [27] H. Chen, Z. Ouyang, R. G. Cooks, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 3738; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3656.
 - [28] R. B. Dixon, M. S. Bereman, D. C. Muddiman, A. M. Hawkrige, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18, 1844.
 - [29] E. O. Aboagye, Z. M. Bhujwalla, *Cancer Res.* **1999**, 59, 80.
 - [30] K. Glunde, C. Jie, Z. M. Bhujwalla, *Cancer Res.* **2004**, 64, 4270.
 - [31] E. Iorio, D. Mezzanzanica, P. Alberti, F. Spadaro, C. Ramoni, S. D'Ascenzo, D. Millimaggi, A. Pavan, V. Dolo, S. Canevari, F. Podo, *Cancer Res.* **2005**, 65, 9369.
-