

Взгляд, различающий молекулы

iMScore TRIO: революция в области МС-визуализации



iMScore TRIO – визуализирующий масс-микроскоп

Технология масс-спектрометрической визуализации с использованием оборудования MALDI, активно развивающаяся последние несколько лет, находит все большее применение в самых различных областях науки, технологии и промышленности. Специализированное программное обеспечение, комбинируя масс-спектры, полученные в каждой точке образца, формирует картину двумерного пространственного распределения множества молекул (масс-спектрометрическое изображение или МС-изображение). В отличие от традиционной масс-спектрометрии, которая не позволяет определять локализацию целевых соединений в образце, методы МС-визуализации наряду с точной идентификацией соединений обеспечивают получение важной информации о пространственном распределении их в исследуемых биологических тканях или других образцах.

Переход исследований в области молекулярной идентификации

на качественно иной уровень стал возможен после того, как в 2014 году корпорацией Шимадзу был представлен визуализирующий масс-микроскоп iMScore TRIO. Это уникальное оборудование сочетает в одном корпусе оптический микроскоп, гибридный масс-спектрометр и систему ионизации MALDI/LDI при атмосферном давлении. Такая кооперация позволяет получить и совместить в ходе одного эксперимента три принципиально разных изображения образца: полученное в проходящем/отраженном свете, полученное путём флуоресцентной микроскопии и полученное путём обработки результатов масс-спектрометрического анализа.

Таким образом, можно, например, путём сопоставления изображений образца, полученных методами традиционной микроскопии, с информацией о пространственном распределении в нём тех или иных молекул установить природу различных морфологических аномалий.

Наивысший уровень пространственного разрешения в мире

Ионизация исследуемого образца осуществляется в iMScore TRIO методом MALDI (лазерной десорбции/ионизации при содействии матрицы) при атмосферном давлении. При сканировании образца быстродействующим твёрдотельным лазером можно варьировать диаметр его пучка в диапазоне от 5 до 200 мкм. Благодаря этому достигается наивысший на сегодняшний день уровень пространственного разрешения при молекулярной визуализации: образец может быть просканирован с шагом всего в 5 мкм.

Ионизированные молекулы образца далее анализируются при помощи гибридного масс-спектрометра, состоящего из квадрупольной ионной ловушки и времяпролётного анализатора масс с рефлекторным. Тандемный режим работы масс-спектрометра (МС/МС) существенно увеличивает соотношение «сигнал/шум» и, соответственно, позволяет «увидеть» следовые количества целевых соединений в образце. К тому же гибридная конструкция масс-спектрометра даёт возможность наряду с определением точной молекулярной

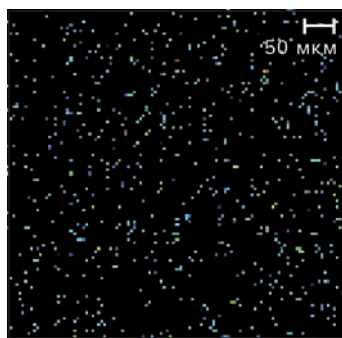


Рисунок 1а: МС/МС-изображение распределения кверцетина (m/z 269,2 → 224,97) в срезе ткани печени крысы

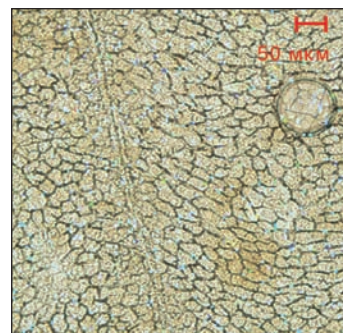


Рисунок 1б: Наложение оптического изображения среза ткани печени крысы и МС/МС-изображения кверцетина

массы ионов проводить эксперименты в режиме МС³, то есть осуществлять последовательную фрагментацию одной выбранной ионизированной молекулы до 10-ти раз. Это позволяет, во-первых, точно идентифицировать соединение, а во-вторых, получать важную информацию о его структуре.

В отличие от традиционных систем молекулярной визуализации iMScore TRIO позволяет получать и обрабатывать данные масс-спектрометрического анализа с высокой скоростью (6 пикселей в секунду). Благодаря этому получение и обработка изображения размером 250 x 250 пикселей (62500 пикселей) занимает менее трёх часов. Ещё одной интересной особенностью прибора является возможность установки традиционной системы ионизации электрораспылением (ESI), что превращает его в классический жидкостный масс-спектрометр высокого разрешения.

Широкая область применения

iMScore TRIO может найти применение в исследовательских лабораториях университетов, фармацевтических компаний, медицинских исследовательских центров, предприятий пищевой, электронной и химической промышленности. Лишь некоторые примеры использования iMScore TRIO включают: выявление маркеров заболеваний на основе различий в распределении характеристических молекул в здоровой и больной тканях; фармакокинетические исследования – изучение пространственного распределения, накопления и метаболизации лекарственных средств

в тканях; изучение механизма распределения наркотических и токсичных соединений в тканях и механизма взаимодействия токсинов с тканями организма; контроль содержания и локализации тех или иных ингредиентов в продуктах питания; высокоэффективный контроль поверхности готовых изделий электронной и химической промышленности, поиск и идентификация микровключений. В качестве примера использования iMScore TRIO для фармацевтических исследований можно привести эксперимент по изучению распределения кверцетина в тканях печени. Этот эксперимент наглядно демонстрирует преимущество комбинирования оптических и МС-изображений в одном эксперименте по сравнению с традиционными методами молекулярной визуализации. На рис. 1а приведено изображение пространственного распределения кверцетина в срезе ткани печени крысы, полученное при помощи масс-спектрометрии MALDI. На первый



Рисунок 2: Увеличенный фрагмент изображения на рисунке 1b демонстрирует, что кверцетин локализован в межклеточном пространстве и на клеточных стенках

взгляд, распределение кверцетина в образце носит случайный характер, но после того, как МС-изображение было совмещено с изображением той же области образца, полученным с помощью оптического микроскопа (рис. 1b), стала очевидной корреляция между локализацией кверцетина и определёнными структурами ткани. Если увеличить полученное комбинированное изображение (рис. 2), отчётливо видно, что весь кверцетин локализован в межклеточном пространстве либо на клеточных стенках и не проникает в клетки ткани.

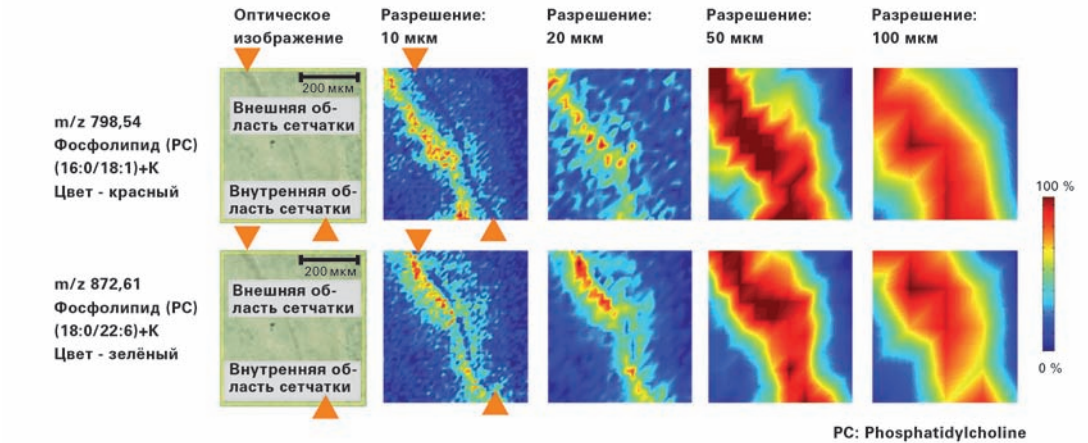


Рисунок 3: Оптическое изображение фрагмента сетчатки глаза и МС-изображения пространственного распределения в нем фосфолипидов, полученные с разным уровнем пространственного разрешения

При этом стоит отметить, что, если бы сканирование производилось лазером с большим диаметром пучка, получить точную информацию о пространственной локализации кверцетина в ткани было бы невозможно.

Уровень пространственного разрешения определяется объектом исследования

Уровнем пространственного разрешения iMScore TRIO можно варьировать в зависимости от объекта исследования. Очевидно, что изучение локализации лекарственных средств и их метаболитов в тканях (как в описанном выше примере) требует максимального разрешения. Если же речь идёт

об исследовании структуры достаточно больших образцов тканей, можно использовать средний уровень пространственного разрешения. Например, для изучения липидного состава сетчатки глаза достаточно пространственного разрешения 10 мкм. На изображе-

нии области сетчатки, полученном с помощью оптического микроскопа (рис. 3), отчётливо виден пигментный эпителий сетчатки в виде тёмной полосы, отделяющей внешнюю область сетчатки от внутренней. Справа показаны МС-изображения пространственного распределения двух фосфолипидов ($m/z = 798,54$ и $m/z = 872,61$) в этом же образце, которые были получены при уровнях разрешения 10, 20, 50 и 100 мкм. Как видно из рисунка 3, получить точную картину пространственного распределения двух фосфатидилхолинов удалось только при использовании разрешения 10 мкм. Более низкие уровни пространственного разрешения приводят к «размыванию» картины и невозможности определения точной локализации. позволяет получать, накапливать и обрабатывать данные, полученные как с помощью оптического микроскопа, так и с помощью масс-спектрометрии MALDI. Уникальной особенностью Imaging MS Solution является возможность комбинировать (накладывать друг на друга) оптические и МС-изображения. На рисунке 4 показан результат наложения МС-изображений трёх фосфатидилхолинов, полученных в ходе описанного выше эксперимента. Такое комбинированное изображение даёт отчётливую картину пространственной дифференциации фосфолипидов: фосфатидилхолин (16:0/22:6) наблюдается исключительно во внешней области сетчатки, а фосфатидилхолин (16:0/18:1) и фосфатидилхолин (18:0/22:6) локализованы во внутренней области, причём последний расположен практически на пигментном эпителии сетчатки.

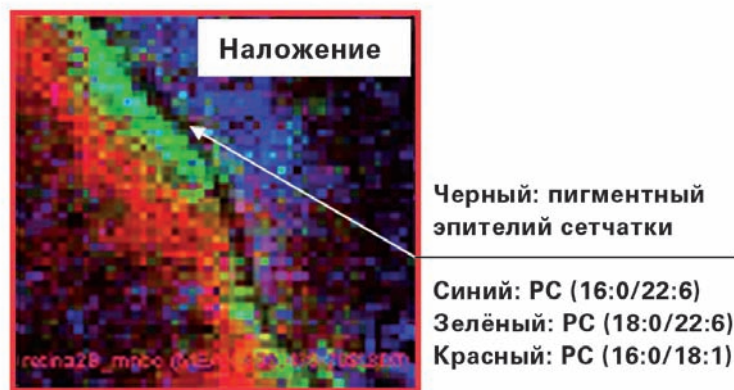


Рисунок 4: Наложение МС-изображений трёх фосфолипидов

об исследовании структуры достаточно больших образцов тканей, можно использовать средний уровень пространственного разрешения. Например, для изучения липидного состава сетчатки глаза достаточно пространственного разрешения 10 мкм. На изображе-

Программное обеспечение для получения, накопления и обработки данных

Специально разработанное для работы с iMScore TRIO программное обеспечение «Imaging MS Solution»

Программное обеспечение включает также мощные инструменты для статистической обработки полученных результатов: иерархический кластерный анализ (Hierarchical Cluster Analysis, HCA), сравнение двух или нескольких зон образца (Region of Interest Analysis, ROI) и выявление доминирующего соединения (Principal Component Analysis, PCA).

Нанесение матрицы без ущерба для пространственного разрешения

Наряду с характеристиками масс-спектрометра важную роль в получении МС-изображений с наивысшим уровнем

пространственного разрешения играет и процесс подготовки образца к анализу, в частности, процесс нанесения матрицы. Традиционный метод нанесения жидкой матрицы на образец путём напыления может приводить к образованию на поверхности довольно крупных кристаллов, что влечёт за собой ухудшение пространственного разрешения получаемых МС-изображений. К тому же всегда существует риск, что це-

левые соединения могут раствориться в матрице и, соответственно, картина их пространственной локализации будет необратимо нарушена. Поэтому для молекулярной визуализации специалисты компании Шимадзу рекомендуют использовать специально разработанное устройство iMLayer, предназначенное для вакуумного осаждения матрицы на образец из газовой фазы. iMLayer™ работает со всеми типами используемых

в масс-спектрометрии MALDI матриц и обеспечивает получение тонких мелкозернистых (размер кристалла ~ 1 мкм) слоёв. Такой равномерный слой матрицы существенно улучшает пространственное разрешение при масс-визуализирующих экспериментах.

Заключение

Комплекс iMScope TRIO, Imaging MS Solution и iMLayer является

на сегодняшний день уникальным инструментом для МС-визуализации, предлагая исследователям непревзойдённый уровень пространственного разрешения масс-спектрометрии MALDI в сочетании с высочайшими характеристиками оптического микроскопа и продвинутыми возможностями обработки результатов с помощью программного обеспечения.

ПРИМЕНЕНИЕ

Секреты швейцарских часов

»В нашей лаборатории мы раскрываем все секреты применяемых материалов«



В горах Юра в нескольких километрах к югу от французской границы во французско-говорящей части Швейцарии расположен город Ла-Шо-де-Фон. Это место является крупнейшим в стране центром производства часов и входит в число памятников всемирного наследия ЮНЕСКО как выдающийся пример «города-фабрики». Город является родиной компании Metallo-Test SA – независимой лаборатории, аккредитованной для тестирования материалов и элементов, применяемых при производстве часов. Помимо своей основной деятельности, лаборатория сотрудничает с медицинскими организациями, предприятиями микроэлектроники, производителями телефонов, пишущих инструментов, изделий из кожи, очков, игрушек,



Рисунок 1: Хроматограф Nexera с фотодиодным матричным детектором

упаковочных материалов, а также с предприятиями автомобильной промышленности и организациями, занимающимися защитой окружающей среды.

Компания внимательно следит за обновлением существующих нормативных документов, а также за введением в практику новых законодательных актов, ограничивающих применение тех или иных химических компонентов, применяемых для производства различных товаров. В течение тридцати лет лаборатория активно расширяет возможности своей лаборатории, регулярно инвестируя в аналитическое оборудование. Ниже деятельность компании будет показана на примере анализа компонентов, из которых производятся наручные часы.

Биологическая совместимость и соответствие требованиям REACH материалам, из которых изготовлены наручные часы

REACH (Registration Evaluation Authorization of Chemicals – регистрация, оценка и авторизация химических веществ) – это технический регламент Евросоюза «Порядок государственной регистрации, экспертизы и лицензирования химических веществ», имеющий отношение ко всем химическим веществам, производимых в Европе или импортируемых в Европу. В соответствии с этим регламентом химические вещества должны быть зарегистрированы,

а их потенциальный риск для здоровья человека должен быть оценен. Если какое-либо вещество является канцерогеном или компонентом, нарушающим работу эндокринной системы, или органическим загрязнителем, то могут быть наложены ограничения на его применение, а также данное соединение может быть внесено в список SVHC (Substances of Very High Concern), представляющий собой перечень особо опасных веществ.

Часы производятся из большого числа элементов, которые должны отвечать критериям биосовместимости, а также соответствовать требованиям регламента REACH для предотвращения аллергии у потребителей и других проблем. Браслет часов может быть изготовлен из кожи, резины или стали.

Кожаные ремешки для часов: Хром (IV)

Например, большинство кожаных ремешков подвергается воздействию раствора танина, содержащего соли хрома (III). Слабый контроль качества при осуществлении процесса дубления кожи может косвенно привести к окислению Cr(III) до Cr(IV), причём последний является канцерогеном и мутагенным веществом. В связи