

Billeddannende massespektrometri

- stofspecifik imaging af lægemidler og metabolitter i væv

Billeddannende massespektrometri gør det muligt at følge lægemidler og deres omdannelse i organismen. Metoden er med succes benyttet til at følge et lægemiddels fordeling og metabolisme i en mus og et lægemiddels penetration gennem hud.

Af Christian Janfelt, Institut for Farmaci, Københavns Universitet

Billeddannende massespektrometri (MSI, eng: Mass spectrometry imaging) er en særlig disciplin inden for massespektrometri, hvor man udnytter ioniseringsteknikker, der kan ionisere stoffer direkte fra overflader til at optage billeder, som viser fordelingen af stoffer på en overflade. Idet billederne baserer sig på data opnået med massespektrometri, deler MSI en række fordele med mere konventionelle MS-teknikker såsom LC-MS, nemlig en høj grad af selektivitet i analysen kombineret med muligheden for at identificere ukendte stoffer i forbindelse med analysen samt muligheden for at måle på prøver uden at skulle tænke på forudgående mærkning med f.eks. fluorescens eller radioaktivitet.

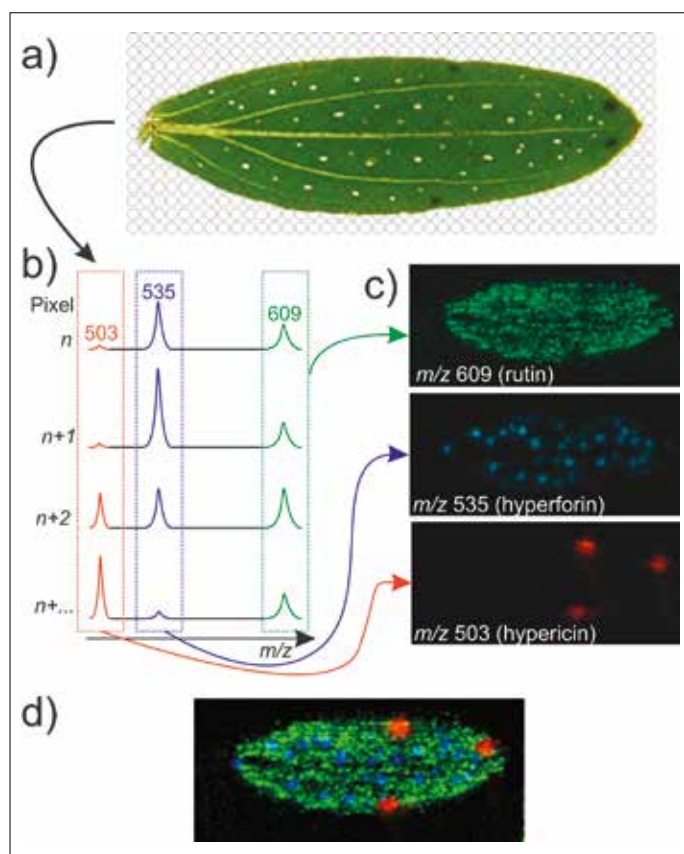
MSI er tidligere beskrevet i to artikler i Dansk Kemi, som beskrev anvendelsen inden for bl.a. planteanalyse [1] og vævsprøver [2], sidstnævnte dog med vægt på analysen af endogene stoffer i væv. I denne artikel vil vi fokusere på brugen af MSI til at følge lægemidler og deres omdannelse i organismen med udgangspunkt i to studier af hhv. et lægemiddels fordeling i en mus [3] og et lægemiddels penetration gennem hud [4].

Hvorfor undersøge fordelingen af lægemidler?

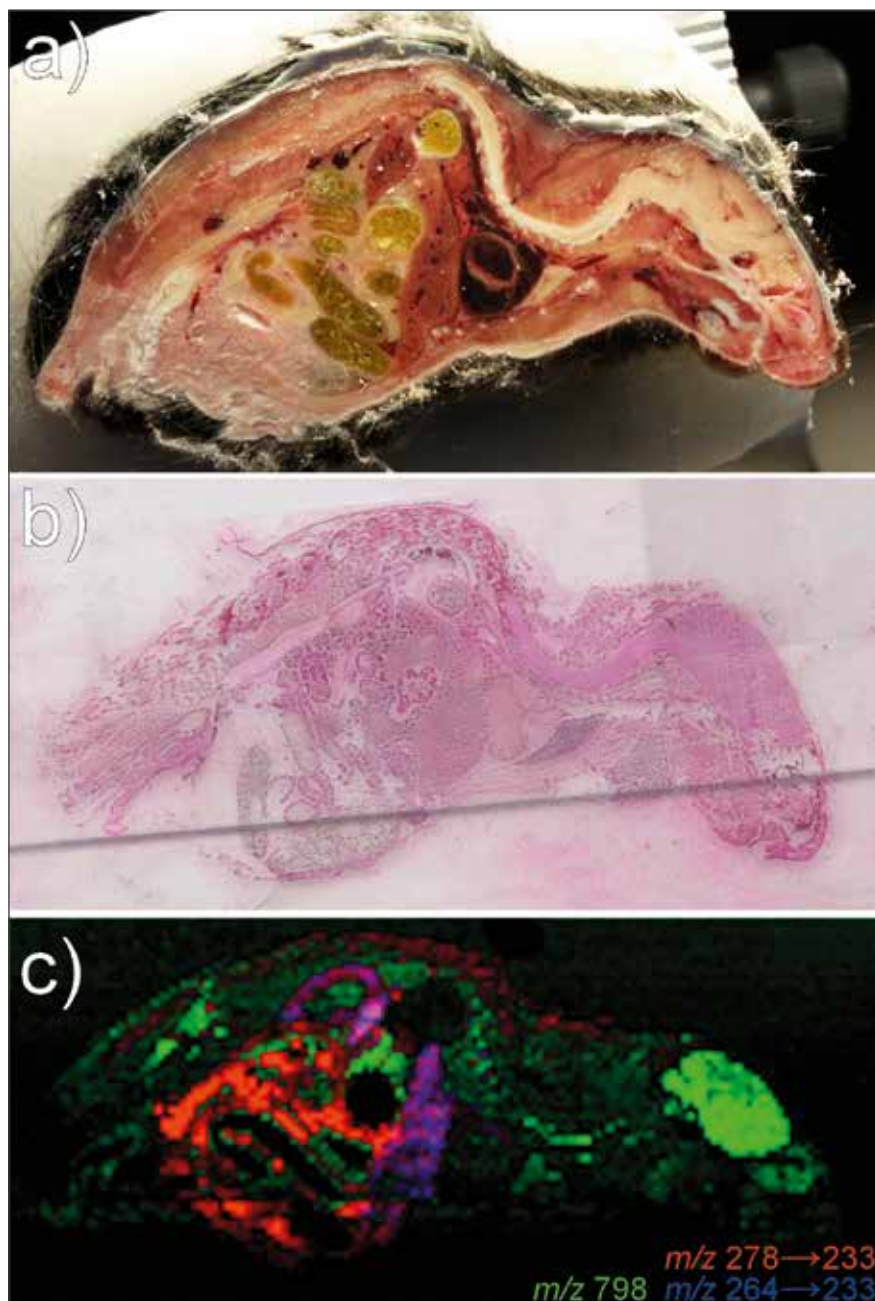
I udviklingen af lægemidler er det af største betydning at kunne undersøge lægemidlers optagelse og kunne redegøre for deres fordeling og omdannelse i organismen. Dette har betydning i discovery-fasen, hvor forskellige lægemiddelkandidater undersøges, og der søges svar på, om lægemidlet er i stand til at trænge igennem de forskellige barrierer i kroppen (f.eks. tarmvæggen eller blod-hjerne barrieren), om det nedbrydes i leveren, inden det har nået at udøve sin effekt, og hvor i organismen de forskellige metabolitter af lægemidlet dannes. Det er også af betydning i development-fasen, hvor det valgte lægemiddel skal formuleres (f.eks. som tablet eller i en creme), hvor den valgte formulering kan have betydning for, hvorledes det aktive stof frigives til organismen.

Der er en udbredt brug af radioaktivt mærkede lægemidler i distributions- og metabolismestudier, idet den detekterede radioaktivitet i f.eks. plasma- og urinprøver kan henføres til det oprindeligt indgivne lægemiddel eller metabolitter af dette. Ligeledes bliver fordelingen af lægemiddel i forsøgsdyr ofte

undersøgt ved brug af Kvantitativ whole-body autoradiografi (QWBA), hvor en radioaktivt mærket udgave af lægemidlet (f.eks. ved udskiftning af et af carbon-atomerne med et ^{14}C)



Figur 1. Princippet i billeddannende massespektrometri (her vist med data fra et billede af et blad fra prikbladet perikon). Prøven scannes således, at der optages et massespektrum i hvert punkt i prøven; hvert massespektrum ender som en pixel i det endelige billede (a). For hver top i massespektrene (b) kan der ud fra intensiteterne af den pågældende masse genereres et billede, som viser fordelingen af stoffet (c). Disse billeder kan kombineres ved at bruge forskellige farver til hvert af stofferne, hvorved der opnås en meget nøje sammenligning af fordelingen af forskellige stoffer i prøven (d). Figuren er fra [5].



Figur 2. DESI-MSI analyse af en mus som har fået en intraperitoneal injektion (i bughulen) af 500 µg af det antidepressive lægemiddel amitriptylin 15 minutter før aflivning. Musen snittes på en cryo-microtom (a), og herved opnås 30 µg tynde vævssnit, som kan analyseres med DESI-MSI. Figuren viser vævssnittet efter en H&E farvning med henblik på opnåelse af bedre optisk kontrast (b). Farvningen er udført efter DESI-MSI analysen. DESI-MSI analysen (c) viser tilstedeværelsen af amitriptylin (vist med rødt) i bughulen samt visse steder i fedtlaget under huden. Metabolitten nortriptylin (vist med blåt) ses i leveren og i nyren. For at vise konturen af dyret er et endogent fosfolipid (fosfatidylcholin(34:1)) afbilledet med grønt. Pixelstørrelsen er 480 µm. Figuren er fra [3].

doseres til en rotte, som efter et givent tidsrum aflives. Derpå fryses rotten ned, og der laves tynde vævssnit af dyret, som placeres på en fotografisk film, hvorved der som følge af de radioaktive henfald fremkommer et billede, som viser fordelingen af det indgivne lægemiddel. QWBA er ligesom de fleste teknikker, som baserer sig på radioaktivitet, særdeles følsom og kvantitativ, men teknikken har to væsentlige begrænsninger. Dels baserer den sig på en radioaktivt mærket udgave af lægemidlet, som er både kostbar og tidskrævende at fremstille, og dels viser QWBA-billeder ikke nødvendigvis fordelingen af det aktive lægemiddel, men blot fordelingen af den radioaktive

label. Det kan således ligeså vel være metabolitter af det oprindelige lægemiddel, som optræder i QWBA-billedet, og i hvor høj grad det er tilfældet afsløres ikke ved et QWBA-studie alene.

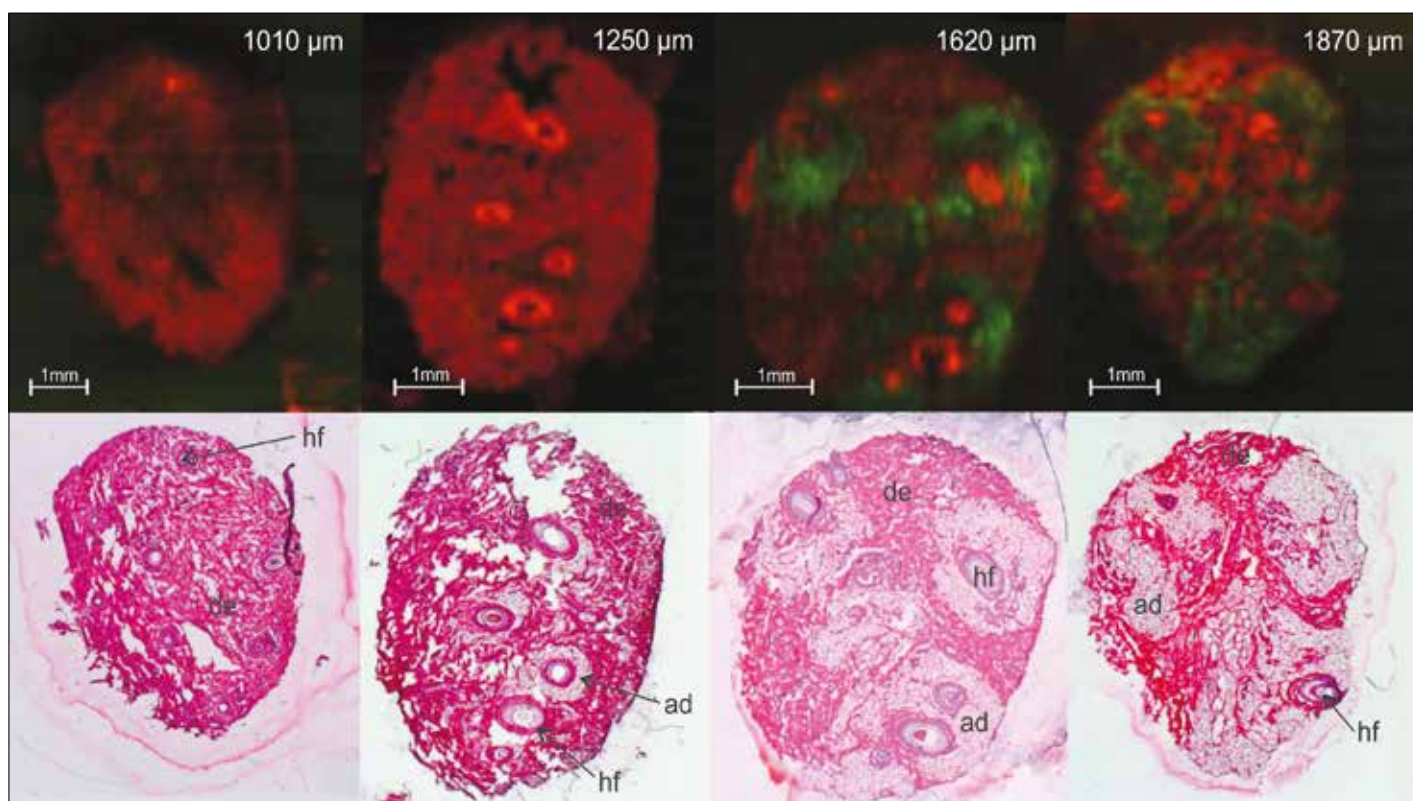
Billeddannende massespektrometri (MSI)

Princippet i MSI er skitseret i figur 1. En prøve scannes linje for linje og punkt for punkt under det sted i massespektrometeret, hvor ioniseringen foregår, og der optages således under eksperimentet et massespektrum i hvert punkt af prøven. Efter et sådant eksperiment af nogle timers varighed har man en samling på tusindvis af massespektre, og ligesom man efter en LC-MS kørsel kan generere adskillige ekstraherede ion-chromatogrammer, som viser, hvornår de forskellige stoffer eluerer, kan man med MSI generere billeder for hvert af stofferne – jo højere intensiteten er for det målte stof i et punkt, jo kraftigere farveintensitet i den pågældende pixel. Når et højopløsende massespektrometer som f.eks. en Orbitrap benyttes, kan der ofte genereres flere hundrede billeder fra ét eksperiment. Derpå kan man, for at vise fordelingen af stoffer relativt til hinanden, lave kombinerede billeder, hvor man viser op til tre stoffer sammen, men i hver sin farvekanal (rød, grøn og blå).

En af fordelene ved MSI er, at man ikke på forhånd behøver at vide, hvad man kigger efter. Man kan optage et billede i den positive ion-mode, og derpå i sin software bladde igennem de forskellige masser, mens fordelingerne af de forskellige detekterede stoffer flyver forbi på skærmen. Hvis en interessant fordeling viser sig, kan man derpå forsøge at identificere, hvilket stof der gemmer sig bag den målte masse (her kan nøjagtig masse-måling og MS/MS være til stor hjælp). En afgørende fordel ved MSI i forhold til andre imaging-teknikker er selektiviteten i teknikken; selv stoffer med meget store ligheder i strukturen kan skelnes, når blot de har forskellig masse. Det betyder, at når vi laver billeder af lægemidler i forsøgsdyr, så er vi sikre på, at det er det pågældende lægemiddelstof, vi ser, og ikke en metabolit af dette, ligesom vi kan lave separate billeder for hver af de enkelte metabolitter.

MSI kan basere sig på forskellige ioniserings-teknikker, og de to mest anvendte ioniserings-teknikker til MSI-analyse af biologiske prøver er MALDI og DESI. DESI-MSI benytter sig

af en elektropray, som udfører en særdeles lokal ekstraktion af analyt fra overfladen efterfulgt af ionisering meget lig den almindelige elektropray ionisering, hvor stoffer ioniseres direkte fra væskefase. Anvendelsen af en spray til ioniseringen er samtidig anledning til den væsentligste begrænsning ved DESI-imaging, nemlig detaljeringsgraden i billederne, som begrænser sig til ca. 50 µm pga. størrelsen på ioniseringspunktet fra sprayeren. MALDI-MSI benytter en laser til ioniseringen, og herved opnås en detaljeringsgrad på typisk ca. 20 µm (men i visse tilfælde helt ned til 2 µm). MALDI-MSI afhænger dog (til forskel fra DESI-MSI) af, at man forud for imaging af prøven ►



Figur 3. DESI-MSI analyse af grisehud, som er blevet påført en 5% creme med det lokalbedøvende stof lidokain; figuren viser horisontale snit fra forskellige dybder i huden. Øverst ses DESI billeder med lidokain vist med rødt og metabolitten 3-OH-lidokain vist med grønt. Nederst ses H&E farvnings af de analyserede vævssnit. Det ses, at penetrationen af lidokain er særligt udtalt ved hårfolliklerne (markeret med hf), og at metabolitten især findes i fedtvævet i de dybere lag (markeret med ad). Pixelstørrelsen er 100 µm. Figuren er fra [4].

påfører den et lag matrixmolekyler, som absorberer UV-lyset fra laseren og hjælper med ioniseringen af analytter i prøven.

Whole-body imaging med DESI-MSI

QWBA har været anvendt i mere end 50 år, og det var derfor oplagt i takt med at de forskellige MSI-teknikker vandt frem inden for de sidste 10-15 år, at teste dem i forhold til den konventionelle QWBA på samme vævssnit. Der er således allerede en række studier, både med DESI- og MALDI-MSI, som netop demonstrerer den markant bedre selektivitet med MSI, men desværre også en følsomhed, som ikke er på niveau med QWBA, idet man ved QWBA i tilfælde af meget små mængder blot kan lade prøven fremkalde i længere tid.

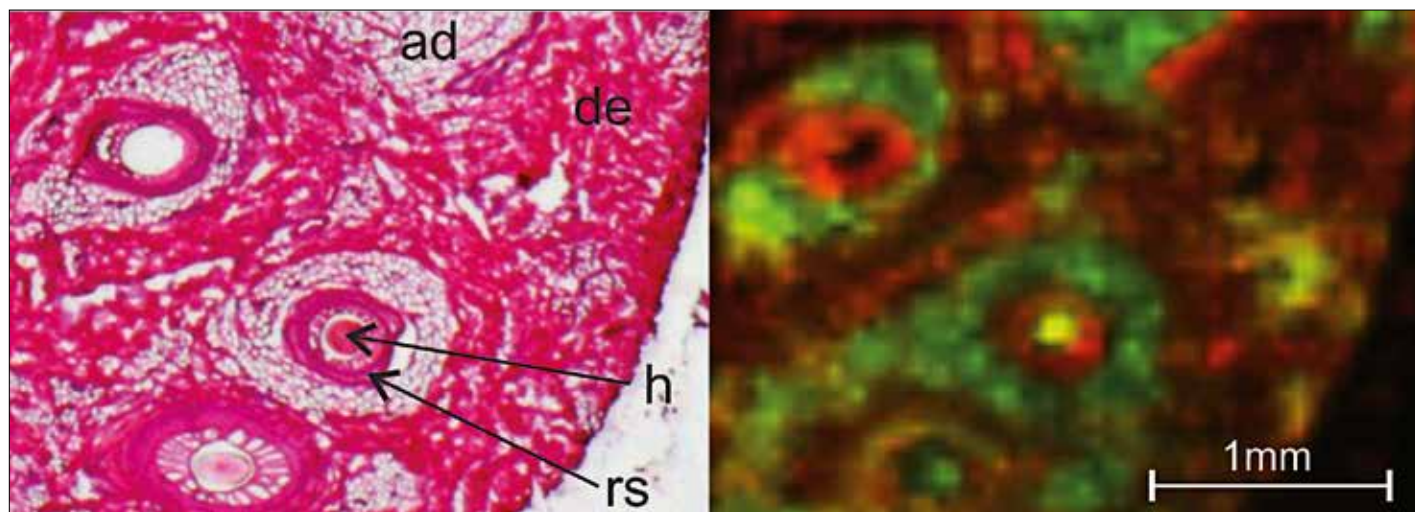
Vi havde et ønske om ikke kun at lave MSI på enkelte organer som hidtil i vores arbejde, men også at kunne måle på hele dyr, så helt andre typer studier blev mulige. Udfordringen i denne sammenhæng var ikke selve MSI-analysen – den er ikke så meget anderledes end ellers, blot kører man med noget grovere detaljeringsgrad, da det er en større prøve, som scannes. I stedet var udfordringen fremstillingen af frysensnit, som er meget større og mere heterogene, end når der snittes biopsier eller enkelte organer. I de hidtidige whole-body-studier var frysensnittene blevet lavet på en cryo-microtom, som er et væsentligt større og dyrere apparat end de cryo-microtomer, som findes på de fleste hospitaler og i mange biomedicinske laboratorier til fremstilling af frysensnit af biopsier og mindre stykker væv. Vi ønskede at udvikle en metode, som kunne fungere med en almindelig cryo-microtom, og løsningen blev at indkøbe en særlig wolframcarbide-klinge, som skærer gennem både knogler og tænder og at opsamle frysensnittene på tape. Metoden begrænser sig til dyr på ca. syv cm længde, hvilket f.eks. gør den anvendelig på voksne hun-mus af C57BL/6 racen.

For at få optimal følsomhed udviklede vi en DESI-MSI-me-

tode, hvor de endogene stoffer blev målt i full-scan, og sideløbende blev der på samme prøve optaget billeder af lægemiddelstof og en metabolit i MS/MS modus, hvorved disse blev målt med markant højere følsomhed.

Et eksempel på resultaterne ses i figur 2, side 13, som viser billeder af en mus doseret med 500 µg af det antidepressive lægemiddel amitriptylin. Lægemidlet blev indgivet i bughulen som en IP-injektion og dyret blev aflivet efter 15 minutter. Det ses, at amitriptylin (vist med rødt) på det tidspunkt primært befinder sig i bughulen, hvor det blev injiceret, men at noget af det allerede har søgt hen i fedtvævet under huden ved ryggen, hvilket kan forklares ved, at amitriptylin er meget lipofilt og ophobes i fedtvæv. Der blev også lavet billeder af nortriptylin (vist med blå), som er den primære metabolit af amitriptylin, og det viste sig, at den allerede efter 15 minutter er at finde i lever og nyrer. En dosis på 500 µg er i forhold til musens størrelse noget over almindelig terapeutisk dosis, men ret normal i denne type studier, bl.a. pga. metodernes begrænsede følsomhed. I et andet forsøg blev dosis sat ned til 50 µg, hvilket svarer til almindelig terapeutisk dosis (om end denne normalt indgives oralt og ikke IP). Også i dette tilfælde kunne vi detektere både lægemiddelstoffet og metabolitten, hvilket demonstrerer tilstrækkelig følsomhed til klinisk relevante studier.

Vi har altså udviklet en særdeles selektiv metode, som kan bruges ved lokalisering af lægemidler og metabolitter i hele dyr, og som er i stand til at afbillede disse sammen med forskellige endogene stoffer, der kan fungere som biomarkører for forskellige vævstyper. Metoden baserer sig på en cryo-microtom til snitning af væv og et ionfælde massespektrometer med DESI-MSI, hvilket også er et billigt instrument i forhold til de fleste MALDI-TOF systemer. Der er alt i alt tale om en relativt low-cost metode til studier, som ellers almindeligvis er forbundet med høje omkostninger.



Figur 4. Samme type prøve og analyse som i figur 3, med et snit fra 1290 μm dybde, men denne gang analyseret med en pixelstørrelse på 50 μm , som giver en højere detaljeringsgrad. Figuren er fra [4].

DESI-MSI studier af transport og metabolisme af lidokain i hud

I et andet projekt benyttede vi DESI-MSI til at undersøge transporten af lægemiddel gennem hud. Det har været diskuteret, hvor stor en rolle folliklerne (hårsækkene) i huden spiller for transporten af lægemidler; nogle har argumenteret for, at de udgør en ubetydelig lille del af hudens overflade og derfor ikke spiller nogen rolle, og andre har hævdet, at de er åbne kanaler ned igennem huden. For at undersøge dette tog vi nogle grise-ører, barberede dem og smurte dem med en 5% lidokainsalve, og lod det trække over 24 timer. Derpå lavede vi frysensnit af vævet, både som tværsnit og som horisontale snit i forskellige dybder.

I vores DESI-MSI analyse af vævet så vi målrettet efter m/z 235, hvor vi ville forvente signalet for lidokain, men i dataanalysen blev vi også opmærksomme på en interessant fordeling af et stof ved m/z 251. Nærmere analyse med MS/MS skulle afsløre, at der var tale om 3-OH-lidokain, altså en metabolit af lidokain, som især lå fordelt i fedtvævet i den dybere del af huden. Dette er eksempel på, hvorledes MSI med sine uventede resultater til tider giver svar på spørgsmål, man end ikke har stillet, idet vi på det tidspunkt mest opfattede metabolisme som noget, der primært sker i leveren og ikke noget, vi havde tænkt os at undersøge i hud. Figur 3 viser horisontale snit af hud i forskellig dybde med fordelingen af lidokain angivet med rød og 3-OH-lidokain i grøn. Som det ses, er det for de dybere snit især omkring folliklerne, at lidokain ses, ligesom det er i fedtvævet i de dybere lag, at 3-OH-lidokain detekteres. Billederne i figur 3 er lavet med en detaljeringsgrad på 100 μm , mens et tilsvarende billede lavet med 50 μm detaljeringsgrad for et snit i 1290 μm dybde ses i figur 4.

Billederne viser, hvorledes MSI kan finde anvendelse i drug-delivery studier i forskellige vævstyper. Den rumlige opløsning er ikke på niveau med, hvad der kan opnås med f.eks. fluorescensmikroskopi, men billederne er væsentlig mere stofspekifikke og kan laves for stort set alle lægemidler, uanset om de fluorescerer eller ej.

Konklusion

Vi har her vist eksempler på, hvor MSI med fordel kan finde anvendelse i moderne lægemiddeludvikling. I whole-body studier er der ikke det store behov for høj detaljeringsgrad, men i stedet høj følsomhed, og her viser DESI-MSI i MS/MS modus sig at være særdeles velegnet. I andre studier inden for drug-

delivery vil det være ønskeligt at kunne se mindre detaljer i billedet end de ca. 50 μm , som DESI tillader. Til sådanne studier har vi gavn af nyligt anskaffet udstyr til MALDI imaging med en detaljeringsgrad på helt ned til 5 μm i pixelstørrelse kombineret med en fremragende selektivitet i analysen takket være koblingen til et Orbitrap massespektrometer. Med dette udstyr har vi således igangsat studier af drug delivery gennem hud (fra gris og menneske), kindslimhinde (gris) og tarm (rotte). I sådanne studier kan man følge lægemiddelstoffets vej igennem barrieren og se, hvilken betydning formuleringen har for penetrationen af lægemiddelstoffet. I den sammenhæng er det unikt for MSI, at det er muligt at visualisere fordelingen af ikke kun lægemiddelstoffet, men også eventuelle kemiske penetrationsfremmere i formuleringen sammen med biomarkører for de forskellige celletyper i prøven. Tilsammen giver disse informationer et væsentligt bedre billede af vekselvirkningen mellem stofferne og dermed nye muligheder for at optimere formuleringerne i udviklingen af mere effektive lægemidler i fremtiden.

Tak

Forfatteren ønsker at takke Forskningsrådet for Natur og Univers (FNU), Forskningsrådet for Sundhed og Sygdom (FSS) og Carlsbergfondet for støtte til anskaffelse af hhv. DESI-MSI ionkilden, MALDI-MSI ionkilden og massespektrometrene benyttet i de omtalte studier.

E-mail:

Christian Janfelt: christian.janfelt@sund.ku.dk

Referencer

1. C. Janfelt, J. Thunig, B. Li, S.H. Hansen, Billeddannende massespektrometri. *Dansk Kemi* 2012, 93/6-7, 12-14.
2. C. Janfelt, N. Wellner, J. Thunig, H.S. Hansen, S.H. Hansen, Billeddannende massespektrometri til analyse af vævsprøver. *Dansk Kemi* 2012, 93/8, 20-23.
3. S. Okutan, H.S. Hansen, C. Janfelt, A simplified approach to cryo-sectioning of mice for whole-body imaging of drugs and metabolites with Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Proteomics* 2016, 16, 1634-1641.
4. J. D'Alvise, R. Mortensen, S.H. Hansen, C. Janfelt, Detection of follicular transport of lidocaine and metabolism in adipose tissue in pig ear skin by DESI Mass Spectrometry Imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 3735-3742.
5. N. Bjarnholt, B. Li, J. D'Alvise, C. Janfelt, Mass spectrometry imaging of plant metabolites – principles and possibilities. *Nat. Prod. Rep.* 2014, 31, 818-837.