

High resolution mass spectrometry imaging for pharmaceutical and clinical applications

Citation for published version (APA):

Huizing, L. R. S. (2022). *High resolution mass spectrometry imaging for pharmaceutical and clinical applications*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Ridderprint. <https://doi.org/10.26481/dis.20220615lh>

Document status and date:

Published: 01/01/2022

DOI:

[10.26481/dis.20220615lh](https://doi.org/10.26481/dis.20220615lh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

6.2 Summary

Since its inception in the 90's Mass Spectrometry Imaging (MSI) has made considerable technological and practical improvements to the point that developments are shifting more towards the application side rather being mostly limited to further fundamental and technological advancements. This thesis presents developments to further push the applicability of MSI for pharmaceutical and clinical research.

Chapter 2 presents a rapid workflow for MSI reducing the entire time from receiving the sample to finishing the MSI measurement to under 30 minutes. In particular for clinical diagnostics this is a critical time point as this is the time set for result delivery of intraoperative diagnostics. A new semi-automated matrix application device based on sublimation is described. This device provides reproducible and sensitive matrix application for lipid analysis. In addition, it is shown that rapid sample preparation can also be achieved by conventional matrix sprayers with limited delocalization, whilst maintaining sensitivity and reproducibility. In addition, the smaller crystal sizes associated with sublimation compared to spraying further enhance its potential for high spatial resolution imaging.

In **Chapter 3** the added value of the spatial component in mass spectrometry analysis is demonstrated. A significant amount of Tofacitinib (Tofa) was found in the lumen of rat intestine despite the fact that the intestines had been thoroughly flushed and Tofa was expected to have been removed from the lumen. This finding would have been missed with conventional LC-MS which could lead to overestimation of tissue-drug concentration.

A novel quantitative method for heterogeneous tissue is described combining tissue-specific calibration curves with the use of an isotope labelled internal standard. This method was used to confirm the presence of high amounts of Tofa in the lumen. In addition, 3D-intensity plots were created which were very suitable to visualize the drug uptake profile through the mucosa of the ileum providing some information in the drug uptake mechanisms. In addition, it was shown that at 1 hour post-dose Tofa was largely absorbed into the tissue whereas at 7 hours post-dose Tofa was large adsorbed to the wall of the intestines.

Tissues were washed with heptane to achieve the required sensitivity to detect Tofa in tissue. Instrument sensitivity was optimized using Continuous Accumulation of Selected Ions (CASI) mode. In this method a narrow isolation window is selected limiting the number of ions entering the ICR to a specific range which greatly boosts sensitivity. Combining the strategies of tissue washing and CASI mode allowed for detection of Tofa on tissue down to 5 µg/g tissue. Despite the enhanced sensitivity it was clear that the level of Tofa in tissue was close to the limit of detection indicating further improvements in instruments to enhance sensitivity are desired.

Chapter 4 investigates the role of sulfatides in intrahepatic cholangiocarcinoma (iCCA). Human iCCA samples were compared to tumour distal control bile ducts and to hepatocellular carcinoma (HCC) and colorectal liver metastases (CRLM). A significant correlation was found between a relative increase in unsaturated versus saturated sulfatides and lower disease-free survival length. Sulfatide levels in CRLM were markedly increased compared to control and other tumour samples. Interestingly, in HCC the sulfatides commonly present in bile ducts were mostly absent. However, a relative increase in odd chain sulfatides was observed which could point to a role in lipid α -oxidation in disease progression of HCC.

A rapid low-resolution MSI screening to identify regions of interest was combined with a high resolution MSI to identify the sulfatides. This to improve the logistical feasibility of measuring a large number of samples, which would take an unfeasible amount of time to measure in its entirety at high resolution. Despite the relatively large number of samples analysed for an MSI experiment (59 in total), sample groups were still small to compensate for the large biological variation inherently present in human samples demonstrating the need for this mixed approach when analysing still bigger patient cohorts with MSI.

6.3 Samenvatting

Sinds de aanvang van Beeldvormende Massa Spectrometrie (BMS) in de jaren 90 hebben er aanzienlijke technologische en praktische verbeteringen plaatsgevonden waardoor huidige ontwikkelingen zich meer verplaatsen richting de toepassingen in plaats van zich vooral te beperken tot fundamentele en technologische verbeteringen. Het werk in deze thesis omschrijft ontwikkelingen om the toepasbaarheid van BMS voor farmaceutisch en klinisch onderzoek voort te drijven.

Hoofdstuk 2 omschrijft een snelle workflow voor BMS waarbij de volledige tijd vanaf ontvangen van de monsters tot het afronden van de meting minder dan 30 minuten is. Vooral voor klinische diagnostiek is dit een kritieke tijd aangezien dit de voorgeschreven tijd is voor het leveren van uitslagen voor intraoperatieve diagnostiek. Een nieuw semi-geautomatiseerd matrix toedienings apparaat gebaseerd op sublimatie wordt beschreven. Dit apparaat biedt reproduceerbare en gevoelige matrix toediening voor analyse van lipiden. Daarnaast wordt aangetoond dat de vlugge weefselvoorbereiding ook mogelijk is met de conventionele matrix verstuiers waarbij delocalizatie wordt beperkt en de gevoeligheid en reproduceerbaarheid behouden blijft. Daarnaast vergroot de kleinere kristal grootte die sublimatie biedt ten opzichte van de verstuiers de potentie voor hoge spatiele resolutie beeldvorming.

In Hoofdstuk 3 wordt de toegevoegde waarde van de ruimtelijke component aan massa spectrometrische analyse gedemonstreerd. Een significantie hoeveelheid Tofacitinib (Tofa) werd aangetroffen in het lumen van darmen van de rat ondanks dat deze grondig gespeeld waren en Tofa geacht werd uit het lumen verwijderd te zijn. Deze vondst zou gemist zijn met conventionele LC-MS waardoor de concentratie medicijn in weefsel overschat kan worden.

Een nieuwe quantitative methode voor heterogeen weefsel wordt beschreven waarbij weefsel-specifieke callibratie-curves worden gecombineerd met een isotoop gelabelde interne standaard. Deze methode is gebruikt om the hoge aanwezigheid van Tofa in het lumen te bevestigen. Daarnaast zijn 3D-intensiteits plots gemaakt die zeer geschikt waren voor het visulizeren van een opname profiel van medicatie door de mucosa van het ileum en zo informatie over het medicatie opname mechanisme te geven. Daarnaast werd

aangetoond dat 1 uur na dosering, Tofa voornamelijk opgenomen was in het weefsel, waarentegen 7 uur na dosering Tofa vooral was gehecht aan de omlijning van de darmen.

Weefsels werden gewassen met heptaan om de benodigde gevoeligheid te behalen voor het detecteren van Tofa in het weefsel. De gevoeligheid van het instrument werd geoptimaliseerd door gebruik van de zogenaamde Continuous Accumulation of Selected Ions (CASI) modus. Met deze methode wordt een beperkt isolatie window geselecteerd om het aantal ionen dat de ICR cel bereikt te beperken tot een specifiek bereik waardoor de sensitiviteit enorm gestimuleerd wordt. Het combineren van de strategieën van het wassen van de weefsels en de CASI modus maakte het mogelijk om Tofa te detecteren tot een concentratie van 5 µg/g weefsel. Ondanks de toegenomen gevoeligheid was het duidelijk dat de hoeveelheid Tofa in weefsel nog altijd rond de detectie limiet lag wat aantoont dat verbeteringen van apparatuur om gevoeligheid te verbeteren nog altijd gewenst is.

Hoofdstuk 4 onderzoekt de rol van sulfatiden in intrahepatisch cholangiocarcinoom (iCCA). Humane iCCA weefsels werden vergeleken met tumor-distale controle-galwegen en met hepatocellulair carcinoom (HCC) en colorectale lever metastasen (CRLM). Een significante correlatie werd aangetoond tussen een relatieve toename van onverzadigde versus verzadigde sulfatiden en afgenomen ziekte-vrije overleving. Het sulfatide niveau was duidelijk toegenomen in CRLM in vergelijking met de controle en andere tumor monsters. Interessant genoeg waren in HCC de sulfatiden die veelal aanwezig zijn in de galwegen afwezig. Daarentegen was er een relatieve toename van oneven versus even keten sulfatiden wat kan duiden op een rol van lipide α -oxidatie in de ziekte ontwikkeling van HCC.

Voor dit werk werd een snelle lage-resolutie BMS screenings methode gebruikt om de relevante gebieden te identificeren gecombineerd met een hoge resolutie BMS methode voor identificatie van sulfatides. Dit om de logistieke haalbaarheid van het meten van grote hoeveelheden weefsel te verbeteren wat een onhaalbare hoeveelheid tijd zou kosten om volledig met hoge resolutie te meten. Ondanks de relatief grote hoeveelheid gemeten weefsels voor een BMS experiment (59 totaal), waren de groepen nog steeds klein om te compenseren voor de grote biologische spreading die inherent is aan het humane weefsels,

daarmee de noodzaak aantonend van deze strategie voor het analyseren van nog grotere patient cohorten met BMS.