

Sejtrobbantás és nanofotonika az egyedi sejtek anyagcseréjének felderítésére

In memoriam Dr. Irinyi György

VÉRTES Ákos*

The George Washington University, Department of Chemistry, 800 22nd Street, N.W., Washington, DC 20052, USA

1. Bevezetés

A biológiai rendszerek molekuláris szintű feltérképezése az elmúlt két évtizedben egy meghatározó módszertani átalakuláson ment keresztül. A korábban egyeduralkodónak számító populáció-alapú, átlag összetételen alapuló megközelítések, amelyek jellemzően egymillió vagy annál több sejt összevont választát elemezték több esetben átadták helyüket az egyedi sejtek felbontására képes technológiáknak. Ez a változás egyelőre főként a transzkriptomikában figyelhető meg, de már vannak kezdeti kísérletek az egyedi sejtek proteinjeinek és anyagcsere termékeinek analizésére is. Ez a váltás nem csupán technikai finomítás, hanem a biológiai komplexitás megértésének alapvető feltétele. Az analitikai kémia szempontjából a populációs átlagképzés egy kritikus torzítást hordoz: elrejt a sejtpopuláción belüli funkcionális heterogenitást, ami a daganatos transzformáció, a gyógyszerrezisztencia vagy a fertőzőési folyamatok korai fázisában fontos információforrás lehetne.

A modern diagnosztika és a személyre szabott orvoslás számára ez a „statisztikai elmosódás” elfogadhatatlan, hiszen a kritikus biológiai döntések gyakran egy marginális alpopulációban valósulnak meg, amelynek jelzéseit a populációs átlag teljesen elnyomja. Az egyedi sejtek analizálása tehát nem technikai öncél, hanem a klinikai szükségszerűség és a rejtett fenotípusok azonosításának záloga.

2. A sejtpopulációk heterogenitása és az átlagolás korlátai

A biológiai rendszerekben a sejtek összetétele még azonos szöveti környezetben is jelentős eltéréseket mutathat. Ez a heterogenitás eredhet a sejtciklus különböző fázisaiból, az epigenetikai szabályozás finom különbségeiből vagy a mikrokörnyezeti hatásokból. A hagyományos mérések során a sejteket homogenizálják, ami a térbeli információk elvesztésével és az egyedi sejtekhez kötődő válaszok kioltásával jár.

A rákos daganatok esetében például a kemoterápiás kezelés után megmaradó, rezisztens sejtek csak egy apró töredékét teszik ki a tumor tömegének. Egy átlag összetétel mérés so-

rán ezeknek a sejteknek a metabolikus profilja láthatatlan marad, így a rezisztencia kialakulását csak akkor észleljük, amikor az alpopuláció már dominánssá válik. Az egyedi sejtanalitika ezzel szemben lehetővé teszi ezen „ritka események” detektálását, ami a korai beavatkozás kulcsa. Az adatok elemzése során feltárt bimodális vagy multimodális eloszlások igazolják a rejtett fenotípusok létezését. Egy egészségesnek tűnő szövetben megjelenő daganatos sejtpopuláció jele egy második csúcs formájában jelentkezik a statisztikai eloszlásban, amelyet az átlagolás elfedne.

Az egyedi sejtanalitika megvalósítása során olyan méretskálákon kell operálnunk, ahol a makroszkópos módszerek már nem használhatók. A pikoliteres és femtoliteres térfogatú sejtek anyagcseréjének mérése során három fő gátló tényezővel szembesülünk, amelyek radikálisan új analitikai stratégiát követelnek. Ezek az extrém kis térfogat, az amplifikáció hiánya, és a gyors metabolikus konverzió.

A biológiai diverzitás drasztikus különbségeket mutat a sejttérfogatban, ami megköveteli a mérési technológiák differenciálását a vizsgált sejttípus méretétől függően. Az élővilág országai szerint a sejtek térfogatában több nagyságrendnyi eltérést találunk. Ezt bizonyítják a növényi sejtek, (például a lúdfű, *Arabidopsis thaliana*, levelének felhámsejtjei ~20 pL), állati sejtek (például az emberi májsejtek ~5 pL), egysejtű gombák (például élesztő sejtek ~30 fL) és baktérium sejtek (például *Escherichia coli* ~1 fL) esetén megfigyelt különbségek. A baktériumok és a növényi sejtek közötti közel 20000-szeres térfogatbeli eltérés rávilágít arra, hogy egyetlen univerzális eljárás nem elegendő az összes sejttípus analizéséhez.

Szemben a genomikával vagy a transzkriptomikával, ahol a polimeráz-lánreakció technológia lehetővé teszi a nukleinsavak molekuláris dúsítását, a metabolomikában és a proteomikában nincs molekuláris amplifikáció.^{1,2} Ez azt jelenti, hogy az elemzés során csak azok a molekulák állnak rendelkezésre, amelyek eredetileg is jelen voltak a sejtben. Az érzékenységnak tehát eredendően az ultranyom tartományban kell lennie, hiszen egyetlen sejtben számos metabolit mennyisége az attomol vagy zeptomol környékére esik.

* Tel.: +1 (202) 994 2717; e-mail: vertes@gwu.edu.

(A cikk Vértés Ákos, az MTA külső tagja, 2026. április 21-én elhangzott akadémiai székfoglaló előadásának szerkesztett változata.)

Egyes vegyületek átalakulási sebessége rendkívül magas lehet a sejten belül. Különösen a kisebb sejtekben, mint az élesztő vagy a baktériumok, a metabolit (pl. az ATP) koncentrációk a környezeti ingerekre adott válaszként másodperceken belül megváltozhatnak. Az analízisnek ezért gyorsabbnak kell lennie a sejt fiziológiás válaszüzeneténél, különben csak mérési hibákat rögzítünk, nem a sejt valódi állapotát.

3. Kapilláris mikromintavételezés és ionmozgékonyasági elválasztás

Az egyedi sejtanalízis kiindulópontját a kutatócsoportban a manuálisan végzett kapilláris mikromintavételezés jelentette.³⁻⁵ A módszer, amelyet a „türelmes diák” eljárásaként is emlegettünk, nagyfokú szakértelmet és finom motoros kontrollt igényelt.

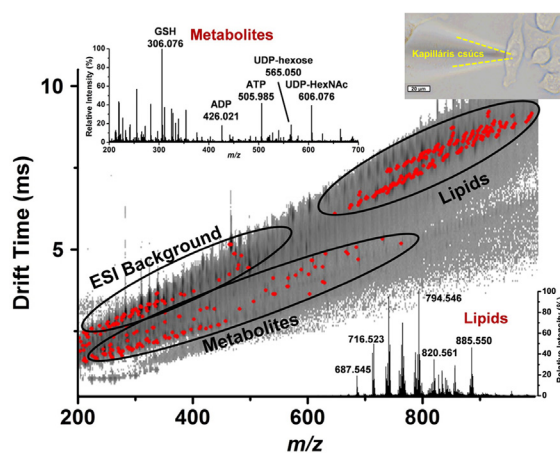
A folyamat során mikroszkóp alatt, a házilag optimalizált alakú tűhegyes üvegkapilláris egy precíziós pumpa segítségével közvetlenül a vizsgált sejt citoplazmájából szív ki körülbelül 0,1 pL mintát. Kritikus szempont a sejtmag inakt állapotának megőrzése, mivel a sejtmag sérülése olyan komponenseket és strukturális anyagokat szabadítana fel, amelyek elnyomnák a keresett metabolit jeleket.

Az ionizáció elektroporlasztással (angolul electrospray ionization vagy ESI) történik, ahol a minta egy nagyfeszültségű térben apró, töltött cseppekre bomlik.⁶⁻¹¹ A cseppecskékből felszabaduló ionok tömeg/töltés aránya (m/z) tömegspektrometria (angolul mass spectrometry vagy MS) segítségével azonosítható. A rendszer hatékonyságát tovább fokozható ionmozgékonyasági elválasztás (angolul ion mobility separation vagy IMS) hozzáadásával. Az IMS során az ionok egy inert gázzal töltött csőben sodródhatnak, ahol az ütközések révén nemcsak tömeg/töltés (m/z) arányuk, hanem alakjuk, méretük és ütközési hatáskeresztmetszetük (angolul collision cross section vagy CCS) szerint is szétválnak.^{3, 12, 13}

Az IMS-MS eredményeként nyert ion intenzitások sodródási idő (angolul drift time vagy DT) és m/z szerinti ábrázolása (mobiligram) lehetővé teszi a lipid és metabolit jelek elkülönítését a kémiai háttérzajtól (1. Ábra). A DT plusz dimenzió drasztikusan növeli a szelektivitást, lehetővé téve olyan izobár vegyületek megkülönböztetését is, amelyek m/z értéke megegyezik, de szerkezetük eltérő.

A módszer hatékonyságát bizonyítja, hogy egyetlen humán májsejtől vett 0,1 pL-es mintában 22 metabolitot és 54 lipidet sikerült azonosítani. Bár az eljárás információtartalma igen magas, az alacsony áteresztőképesség (kevés sejt/óra) sürgette az automatizált rendszerek felé való elmozdulást.

A kifejlesztett módszer lehetővé tette az egyedi sejtek életani állapotának mennyiségi leírását. Az egyik legfontosabb ilyen paraméter az adenilát-energiatöltés (angolul adenylate energy charge vagy AEC), amely a sejt metabolikus egészségének indikátora.



1. Ábra. Egyetlen humán májsejtől vett minta (jobb felső sarok) ESI-IMS-MS segítségével előállított mobiligramja lehetővé tette 22 metabolit (spektrum a bal felső sarokban) és 54 lipid (spektrum a jobb alsó sarokban) azonosítását. (Reprinted and adapted with permission from Zhang L.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 10397. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02502>. Copyright 2015 American Chemical Society.)

Az AEC értékét az ATP, ADP és AMP koncentrációk alapján határozzuk meg az alábbi képlettel:

$$AEC = ([ATP] + 0,5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$$

Az AEC érték mindig 0 és 1 között mozog. Egészséges, aktív anyagcseréjű sejtekben az AEC értéke jellemzően 0,8 felett van. Stressz vagy mérgezés hatására ez az érték 0,5 alá csökken.

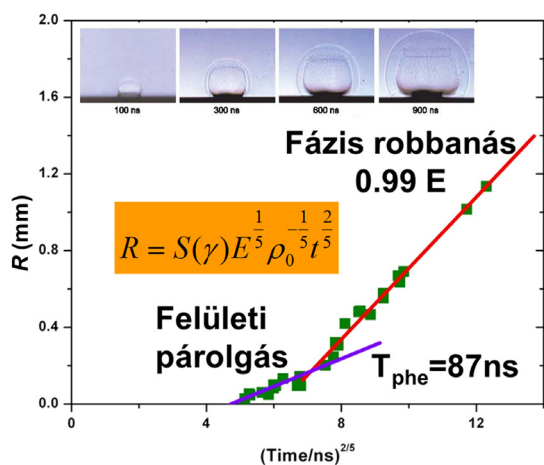
A fent leírt egyedi sejtanalízis hasznának bemutatásához humán májsejteket kezeltünk rotenonnal (egy ismert rovarirtó), amely mitokondriális méregként gátolja a sejtek ATP termelését. A méréseink szerint a kezelt sejtek AEC értéke $0,82 \pm 0,12$ -ről $0,16 \pm 0,12$ -ra zuhan.⁵ Ennek biokémiai oka a rotenon gátló hatása az elektronszállító lánc I. komplexére (NADH-dehidrogenáz), ami a mitokondriális ATP-szintézis összeomlásához és a sejt energiaraktárainak kiürüléséhez vezet. Az AEC drasztikus csökkenésén túl az egyedi sejtanalízis azt is feltárta, hogy a populáción belül a válasz nem egyenletes: a sejtek egy része gyorsabban, míg mások lassabban érik el a kritikus energiahányos állapotot.

4. Lézer abláció és sejtrobbantás

A nagy áteresztőképességű, in vivo mérések kulstechnológiája a lézerablációs elektroporlasztásos ionizáció (angolul laser ablation electrospray ionization vagy LAESI), amelyet 2007-ben fejlesztettünk ki.¹⁴⁻¹⁶ Ez a technológia szükségtelemmé teszi a minta gyakran bonyolult előkészítését és vákuumba helyezését, lehetővé téve élő sejtek és szövetek természetes környezetben történő MS vizsgálatát.

A lézer-anyag kölcsönhatás mechanizmusa. A LAESI módszer egy közép-infravörös (mid-IR) lézert használ 2,94 μm -es hullámhosszon. Ez a specifikus hullámhossz pontosan

a víz -OH kötésének abszorpció maximumával esik egybe. Amikor a lézerimpulzus eléri a víztartalmú biológiai mintát, a sejtben lévő víz elnyeli az energiát, ami extrém gyors melegeedéshez és fázisrobbanáshoz (phase explosion) vezet.^{17, 18}



2. Ábra. A sejtrobbantás hasonlósági modellje két fázisban követi a Taylor kifejezést. A kezdeti felületi párolgást 87 ns után fázisrobbanás követi, amely a lézer impulzus energiájának 99%-át hordozza. (Víz minta egy Q-kapcsolt 70 ns hosszú Er:YAG lézerimpulzus által besugározva $\lambda = 2.94 \mu\text{m}$ hullámhosszon és 5.4 J/cm^2 energiasűrűséggel.) (Reprinted and adapted with permission from Chen, Z.; Vertes, A. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 041503. <https://doi.org/10.1063/1.2243961> Copyright 2006 American Institute of Physics.)

A folyamat fizikai modellezéséhez a Taylor-féle hasonlósági modellt hívtuk segítségül. Geoffrey Taylor 1941-ben (Neumann Jánossal és Leonid Szedovval párhuzamosan) dolgozta ki egy pontszerű nagy erejű robbanás által keltett lökéshullám terjedésének leírását, melyet kilenc évvel később a Trinity-atomrobbantás energiájának megbecslésére használtak az addigra deklasszifikált fotók alapján.^{19, 20} A modell lényege, hogy egy pontszerű energiafelszabadulás után a lökéshullám sugara (R) az idő (t) és a robbanás energiája (E) függvényében skálázódik:

$$R = S(\gamma)\rho_0^{-1/5}E^{1/5}t^{2/5},$$

ahol $S(\gamma)$ egy konstans, ρ_0 pedig a közeg sűrűsége.

A lézerimpulzus által közölt koncentrált energia hatására a sejtben lezajló folyamat analóg egy miniatűr robbanással. A lökéshullám pozíciójának időfüggése, $R(t)$, itt is a Taylor kifejezést követi (2. Ábra). A sejt víztartalmából keletkező gőzfelhő nagy gyorsasággal kilöki a sejt tartalmát, benne a metabolitokat, lipideket, és fehérjéket. Ez a felhő az abláció helyszíne felett elhaladó elektroporlasztással keltett töltött cseppekkel ütközik, ami hatékony ionizációt tesz lehetővé.

Technológiai fejlesztés és automatizáció. Az operatív hatékonyság drasztikus növekedését 2009-ben száloptikai fókuszálással értük el. Egy maratott végű GeO_2 optikai szállal a lézer fókusz átmérőjét $50 \mu\text{m}$ alá csökkentettük, lehetővé téve az egyedi sejtek célzását.²¹⁻²⁴

A sejtpopulációk statisztikailag megbízható jellemzéséhez több mint 1000 egyedi sejtet kellett megvizsgálnunk. Ezt a nagy áteresztőképesség csak a mikroszkópos kontroll nagyfokú automatizálásával lehetett elérni. Míg kézi célzás esetén a LAESI-MS áteresztőképesség <10 sejt/óra volt, teljes automatizálással ezt >800 sejt/óra-ra növeltük.

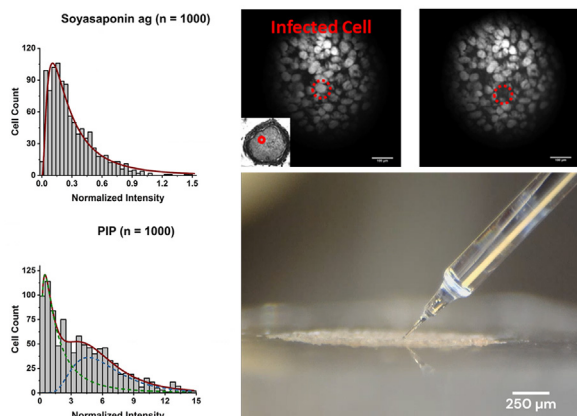
Csúcskészülék és a „sötét metabolom”. Hagyományos metabolomikai méréseknél nagyszámú azonosítatlan, az adatbázisokban sem szereplő spektrális csúccsal találkozunk. Ezek az azonosítatlan, de funkcionálisan fontos metabolitok alkotják a „sötét metabolom”-ot. Az egyedi sejtekből ablációval nyerhető anyagmennyiség (jellemzően pikogrammok) kevés a sok száz metabolit hagyományos MS módszerekkel történő azonosításához. Ezért a LAESI ionforrást kombináltuk a Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) 21 tesla térerősségű Fourier-transzformációs ionciklotron-rezonancia (angolul Fourier transform ion cyclotron resonance vagy FT-ICR) tömegspektrométerével.²⁵ Ez jelenleg a világ legnagyobb teljesítményű MS műszere. A tömegfelbontása meghaladhatja a 10 milliót, és, ami ugyancsak fontos, a tömegpontossága jobb mint 150 ppb.

Izotópos finomszerkezet. A rendszer extrém tömegpontossága és ultramagas felbontása lehetővé teszi az izotópos finomszerkezet (angolul isotopic fine structure vagy IFS) detektálását. Ez azt jelenti, hogy a műszer képes különbséget tenni olyan ionok között, amelyek tömege csak az izotópok magkötési energiájának különbsége miatt tér el. Például a ^{13}C és a ^{15}N izotópok jelenléte által okozott apró de különböző tömegeltolódások alapján a molekulaképlet adatbázis-keresés nélkül is meghatározható.

A módszer erejét mutatja, hogy az IFS adatok alapján egyetlen fertőzött növényi sejtől 47 ismert és 11 eddig ismeretlen vegyület molekulaképletét sikerült szimultán meghatározni.²⁶ Ez a képesség kulcsfontosságú a „sötét metabolom” feltárásában.

Növény-mikroba szimbiózis. Az egyedi sejtanalitika a mezőgazdasági hatékonyság növelésében is fontos szerepet játszik. A szója (*Glycine max*) és a nitrogénkötő baktériumok (*Bradyrhizobium japonicum*) közötti szimbiózis vizsgálata a gyökérgumókban lévő fertőzött és fertőzetlen sejtek egyedi analizisén alapul.

A LAESI és a 21T FT-ICR MS kombinációjával kimutattuk, hogy a fertőzött sejtekben specifikus metabolikus hálózatok aktiválódnak a nitrogénmegkötés támogatására. Ezt mutatja be a 3. Ábra. Míg a normalizált szójaszaponin ag koncentrációk lognormális eloszlást követnek, a foszfatidil-inozit-foszfat (angolul phosphatidylinositol phosphate (PIP)) PIP (20:1/18:2) változatának bimodális eloszlása van. Ez utóbbi két alpopulációval rendelkezik alacsony és magas metabolit szinttel, ami két különböző anyagcsere-állapotnak felel meg és rejtett fenotípusokhoz vezethet.²⁷

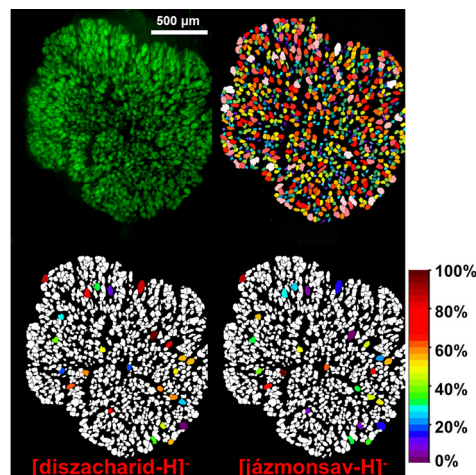


3. Ábra. (Jobbra fent) Szója gyökérgumó fertőzött sejtjei a kiválasztott sejt ablációja előtt (balra) és után (jobbra). (Jobbra lent) A maratott végű optikai szál a lézerpulzust pontosan a kiválasztott sejtbe irányítja. (Balra) Sejtbeli metabolit koncentrációk a vizsgált 1000 sejtben lognormális (mint például a szójaszaponin ag) és bimodális (mint például a PIP (20:1/18:2)) eloszlást mutatnak. Ez utóbbiban két alpopuláció van jelen alacsony és magas metabolit szinttel és ez két különböző anyagcsere-állapotnak felel meg. (Reprinted and adapted with permission from Dolatmoradi, M.; Stopka, S. A.; Corning, C.; Stacey, G.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2023**, 95, 17741-17749. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03651> Copyright 2023 American Chemical Society.)

Unimodális eloszlások és alpopulációk esetében, az anyagcsere heterogenitását a „metabolit zaj”, $\eta^2 = \sigma^2/\mu^2$, segítségével jellemeztük, ahol σ az adott metabolit koncentráció eloszlás szórása és μ a várható értéke. Ez a mennyiség betekintést enged abba, hogy a metabolit szintje a sejtben milyen szorosan van szabályozva.²⁸ Nagyszámú metabolitot vizsgálva az találtuk, hogy a metabolit zaj csak gyengén függ az adott metabolit koncentrációjától.

A metabolomikai képalkotás jövője. A metabolomikai képalkotás és az egyedi sejtszintű mérések fúziója egy két-csatornás mikroszkópiával irányított LAESI-MSI platform formájában öltött testet, amely kiküszöböli a hagyományos képalkotó MS eljárások egyik legsúlyosabb korlátját: a rács-alapú mintavételt.²⁸ A hagyományos MALDI-MSI mérések egy merev rácsot alkalmaznak, ami elkerülhetetlenül a szomszédos sejtek együttes mintavételezéséhez és a spektrumok keveredéséhez vezet a szövetek rendezetlen sejtrendeződése miatt. Ezzel szemben az általunk kifejlesztett, sejtről sejtre történő képalkotás világos látóterű és fluoreszcens csatornákkal felszerelt mikroszkópos rendszert alkalmaz a minták vizsgálatára.

Az integrált szoftver automatikus képszegmentálást és objektum-felismerést végez, amelynek során meghatározzuk az egyedi sejtek geometriai középpontját. Az XY transzlációs asztal ezután egymás után a rögzített optikai szál hegye alá pozicionálja a sejtek közepét az ablációhoz, biztosítva, hogy minden egyes mintavétel kizárólag egyetlen sejtől származó anyagot tartalmazzon. Az egyes sejtekhez tartozó LAESI-MS spektrumban a kiválasztott metabolit relatív intenzitását színskálával jelöljük (4. Ábra).



4. Ábra. (Balra fent) Szója gyökérgumó fertőzött sejtjei fluoreszcens mikroszkóp alatt. (Jobbra fent) A kép szegmentációval azonosított sejteknek megfelelő 936 objektum. Morfometriai elemzéssel 25 nagy sejt lett kiválasztva LAESI-MS analízisre. (Lent) A diszacharid és a növényi stresszrezisztenciában jelentős szerepet betöltő jázmonsav relatív koncentrációk megjelenítése a kiválasztott sejtekben. (Reprinted and adapted with permission from Stopka, S. A.; Wood, E. A.; Khattar, R.; Agtuca, B. J.; Abdelmoula, W. M.; Agar, N. Y. R.; Stacey, G.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2021**, 93, 9677-9687. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00569> Copyright 2021 American Chemical Society.)

Az automatizált képalkotás egyik legnagyobb előnye az affinitás-alapú vagy genetikailag kódolt fluoreszcens próbakkal (például GFP-vel) jelölt sejtek célzott kiválasztása a heterogén szöveti környezetből. Ez a módszer rendkívül értékes az eltérő funkcionális fenotípusú sejtekből álló erősen heterogén szövetek vizsgálatában. Ilyen például a ritka rezisztens sejteket tartalmazó daganatos mikrokörnyezet vagy a pillangósvirágúak gyökérgumójának fertőzési zónája. A LAESI-MSI képalkotási sebessége a kifejlesztett automatizációval eléri a >800 sejt/óra sebességet, lehetővé téve, hogy több mint 1000 sejt összetételének statisztikai elemzésével határozzuk meg a populációk eloszlási mintázatait (például lognormális vagy bimodális koncentráció eloszlások formájában).

A keletkező nagy dimenziószámú spektrális adathalmazok (minden egyes sejtnek több mint 100 egyedi spektrális jellemző társul) kezelésére és vizualizációjára a nemlineáris UMAP (uniform manifold approximation and projection) dimenzióredukciós módszert alkalmaztuk, amely megőrzi a lokális és globális adatszerkezeteket is, így közvetlen kapcsolatot teremt például a sejtmorfológia és a funkcionális metabolikus aktivitás között.

5. Nanofotonika az extrém érzékenyséért

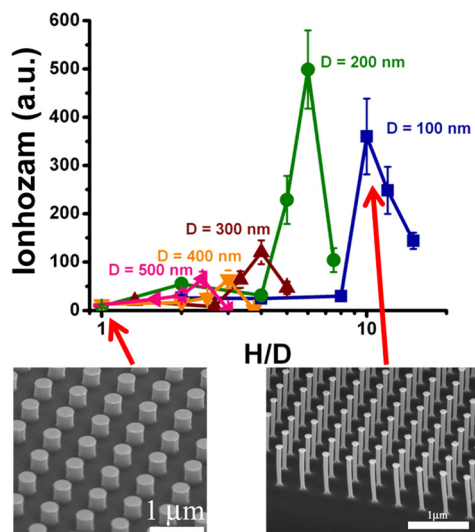
Amikor a sejt mérete a lézer abláció fókuszálhatósági határa alá csökken és sejtrobbantással már nem tudunk megfelelő érzékenységet elérni (például egy ~30 fL térfogatú élesztősejt esetén), új megközelítésre van szükség. Erre a célra fejlesztettük ki az első nanofotonikai ionforrást szili-

cium nanooszlop erdő (angolul nanopost array vagy NAPA) felhasználásával.

A NAPA struktúrák precíziós nanofabrikációval készülnek, ahol az oszlopok átmérője (D), magassága (H) és periódusa (P) szigorúan kontrollált. Ezek az oszlopok optikai antennaként működnek: a méretük összemérhető a gerjesztő fény hullámhosszával, így az oszlopok rezonáns módon fókuszálják az energiát a deszorpcióhoz és ionizációhoz.

Lézer deszorpciós ionizáció (angolul laser desorption ionization vagy LDI) esetén, az oszlopgeometria optimalizálásával bizonyos méretarányoknál (H/D arány) az ionhozam éles rezonanciákat mutat. Például egy $H = 1000$ nm magasságú és $D = 100$ nm átmérőjű oszlop ($H/D = 10$) sokkal hatékonyabb ionizációt tesz lehetővé, mint a nem-rezonáns dimenziók (5. Ábra). A rendszer érzékenysége elképesztő: például verapamil esetében a kimutatási határ eléri a 800 zeptomolt.²⁹⁻³¹

A mérések azt is felfedték, hogy a p -polarizált lézerefény (ahol az elektromos térvektor párhuzamos az oszlopok tengelyével) nagyságrendekkel magasabb ionhozamot ad, mint az erre merőlegesen s -polarizált fény. Ez perdöntő bizonyíték arra, hogy nem egyszerű termikus folyamatról, hanem rezonáns nanofotonikai kölcsönhatásról van szó. Ezenfelül az oszlopok csúcsához közel az erős elektromos tér is segíti az ionizációt.^{32, 33}



5. Ábra. Az oszlop méretarány megfelelő választásával, például $H/D = 10$ esetén, a szilícium nanooszlop erdőre helyezett mintából LDI segítségével maximális ionhozam érhető el. (Reprinted and adapted with permission from Walker, B. N.; Stolee, J. A.; Pickel, D. L.; Retterer, S. T.; Vertes, A. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 4835-4840. <https://doi.org/10.1021/jp9110103> Copyright 2010 American Chemical Society.)

A NAPA hordozó egyik legnagyobb előnye LDI esetén a mátrixmentesség. A hagyományos mátrixszal segített LDI (angolul matrix-assisted laser desorption ionization vagy MALDI) eljárással ellentétben itt nincs szükség külső mátrixanyagra, ami elnyomná a kismolekulás jeleket, így

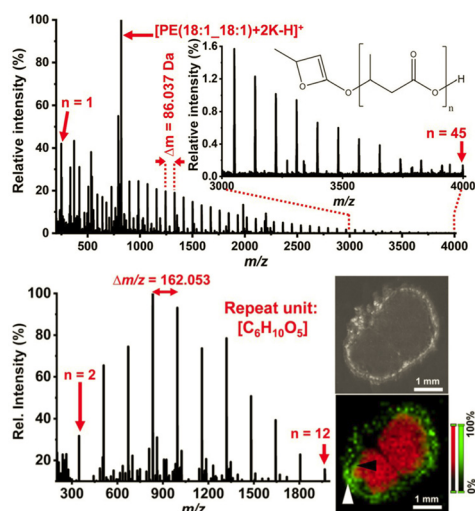
tiszta spektrumok nyerhetők a metabolitok tartományában. Ez különösen fontos előnyt jelent metabolomikai képalkotásban, ahol a NAPA és egyéb nanofotonikus és szeretlen mátrix anyagok a MALDI-nál tisztább, spektrális interferencia mentes képet mutatnak.³⁴

Biooligomerek eloszlása gyökérgumókban. Szimbiotikus növényi rendszerekben, így a szója (*G. max*) és a nitrogénkötő *B. japonicum* kapcsolatából fejlődő gyökérgumókban a biooligomerek felhalmozódása és térbeli eloszlása alapvető élettani jelentőséggel bír. E biooligomerek – mint a baktériumok által szén- és energiaforrásként használt polihidroxibutirát (PHB) – közvetlen tömegspektrometriás leképezése (angolul MS imaging vagy MSI) komoly analitikai kihívást jelent, mivel a hagyományos MALDI-MSI során alkalmazott mátrixok és mintaelőkészítési eljárások elnyomják vagy elmosásuk ezen homopolimer jeleit.

A szilícium nanooszlop erdőkön alapuló mátrixmentes NAPA-LDI-MSI és a hagyományos MALDI-MSI komplementer alkalmazása áttörést hozott ezen oligomerek vizsgálatában.³⁵ A vad típusú *B. japonicum*-mal fertőzött gyökérgumókban a PHB $1 \leq n \leq 45$ ismétlődési egységű oligomerjeit közvetlenül a fertőzési zónában detektáltuk, ahol a baktériumok nitrogénmegkötést végeznek (6. Ábra). A PHB-oligomerek ionhozama a NAPA-LDI-MSI mérésekben 7-szerese, esetenként akár 65-szöröse volt a MALDI-MSI során kapott értékeknek.

A térbeli leképezés feltárta a fertőzési zónán belüli mikrokörnyezeti heterogenitást is: a kisebb oligomerek ($1 \leq n \leq 22$) koncentrációja a fertőzési zóna belsejében volt a legmagasabb, ahol a minimális oxigénszint miatt a PHB szintézise fontos szerepet játszhat a redox-szabályozásban. A nagyobb oligomerek ($23 \leq n \leq 45$) viszont foltszerű eloszlást mutatnak. Az egyes zónákban mért eltérő móltömeg-eloszlások a baktériumok eltérő metabolikus aktivitására – a szintézis és a katabolizmus helyi arányaira – utalnak, ahol egyes területeken a hosszú távú tárolásra szolgáló nagyobb, máshol a könnyen mobilizálható kisebb oligomerek dominálnak. Ugyancsak kizárólag a NAPA-LDI-MSI eljárással sikerült detektálni és leképezni a gyökérgumó külső és belső kéreg zónáiban felhalmozódó oligohexózokat ($2 \leq n \leq 12$).

A biooligomer-szintézis genetikai szabályozásának vizsgálatára a PHB-szintézisben defektív *phaC* mutáns *B. japonicum* törzssel fertőzött gyökérgumókat is elemeztük. Ahogy az várható volt, a *phaC* mutánsok esetében a PHB-oligomerek teljesen hiányoztak a spektrumokból. Ugyanakkor MALDI-MSI mérések meglepő módon egy teljesen új biooligomer, a poliglutaminsav (PGA) jelenlétét mutatták ki a fertőzési zónában és a kéregállományban, amely a vad típusú gumókban nem volt jelen. A PGA oligomerek $1 \leq n \leq 15$ számú ismétlődő egységgel jelentek meg. Ez az eredmény arra utal, hogy a baktériumok a PHB hiánya miatt fellépő energia- és szénhiányt egy alternatív biooligomer, a PGA szintézisével igyekeznek kompenzálni.



6. Ábra. Tömegspektrometriás képalkotás NAPA-LDI segítségével lehetővé teszi a PHB és hexóz oligomerek térbeli eloszlásának felderítését szója gyökérgumókban. (Felül) A NAPA-LDI tömegspektrum a fertőzött belső zónából PHB oligomereknek megfelelő csúcsokat mutat $1 \leq n \leq 45$ értékekkel. (Alul balra) A fertőzött külső kéregből nyert NAPA-LDI tömegspektrum $2 \leq n \leq 12$ méretű oligohexózatokat mutat. (Alul jobbra) A szövetmetszet optikai mikroszkópos képe alatt az $n = 7$ -es oligohexóz (zöld) és az $n = 11$ -es PHB (piros) oligomerek kombinált térbeli eloszlását láthatjuk. (Reprinted and adapted with permission from Samarah, L. Z.; Tran, T. H.; Stacey, G.; Vertes, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9071-9077. <https://doi.org/10.1002/anie.202015251> Copyright 2021 Wiley-VCH GmbH.)

6. Zárszó

Az egyedi sejtek metabolomikája elérte a technológiai érettség azon fokát, ahol a klinikai transzláció és a stratégiai alkalmazások lehetővé válnak. A LAESI és a NAPA-LDI ionforrások komplementer jellege, ahol a LAESI az in vivo képalkotásban és a gyors szűrésben, a NAPA pedig az extrém érzékenységű, kis térfogatú analízisben élenjáró, új távlatokat nyit a biológiai kutatásokban.

A bevezetett ionforrások lehetővé tették, hogy az egyedi sejtekben végzett anyagcsere mérések túllépjenek a populáció átlagok meghatározásának korlátain. A 2IT FT-ICR MS csúcskészülék és a LAESI ionkeltés révén a „sötét metabolom” feltárása és a sejttállapotok precíz numerikus leírása is lehetővé vált. Ez hosszútávon a gyógyszerfejlesztés következő technológiai ugródeszkája lehet és a személyre szabott orvoslást is segíti. A cél már nem csupán a molekulák azonosítása, hanem a sejtszintű heterogenitás mögött rejlő alapvető információk kiaknázása.

Köszönetnyilvánítás

Az elmúlt ötven év alatt lehetőségem volt számos diákkal és közel száz kutatóval való aktív együttműködésre. A nevek felsorolására itt nincs lehetőség, de az eredményekhez való jelentős hozzájárulásokat a közös cikkek társszerzői és a közös találmányok társfeltalálói névsora

tartalmazza. Itt csak öt nevet szeretnék kiemelni. Pályám kezdetén a Központi Fizikai Kutatóintézetben nagy hatással volt rám Matus Lajos kiváló kísérleti érzéke és Schiller Róbert bölcsessége és tudományos tisztánlátása. A belgiumi Antwerpeni Egyetemen Renaat Gijbels tette lehetővé, hogy szakmai tevékenységem tovább szélesedjen. Az utóbbi 35 évben az egyesült államokbeli George Washington Egyetemen Michael Kingnek a Kémia Tanszék vezetőjének tartós támogatása segítette az egyre komplexebb projektek kivitelezését. Az egyedi sejtek analízisének gyakorlati példákon való bemutatására élvezetes és gyümölcsöző együttműködést folytattam Gary Stacey-vel, a Missouri Egyetem növénybiológus kiválóságával. További jelentős munkatársaimról és együttműködéseimről egy nemrég megjelent szakmai visszatekintésben emlékeztem meg.³⁶ Kutatásaimhoz jelentős anyagi támogatást nyújtottak a US Department of Energy, a US National Science Foundation, a U.S. Defense Advanced Research Projects Agency, a U.S. Intelligence Advanced Research Projects Activity, a W. M. Keck Foundation, és a Protea Biosciences, Inc.

Hivatkozások

- Zhang, L.; Vertes, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 4466-4477. <https://doi.org/10.1002/anie.201709719>
- Dolatmoradi, M.; Samarah, L. Z.; Vertes, A. *Analysis & Sensing* **2022**, *2*. <https://doi.org/10.1002/anse.202100032>
- Zhang, L.; Foreman, D. P.; Grant, P. A.; Shrestha, B.; Moody, S. A.; Villiers, F.; Kwake, J. M.; Vertes, A. *Analyst* **2014**, *139*, 5079-5085. <https://doi.org/10.1039/C4AN01018C>
- Zhang, L.; Sevinsky, C. J.; Davis, B. M.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4626-4634. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05126>
- Zhang, L.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 10397-10405. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02502>
- Marginean, I.; Parvin, L.; Heffernan, L.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4202-4207. <https://doi.org/10.1021/ac049817r>
- Parvin, L.; Galicia, M. C.; Gauntt, J. M.; Carney, L. M.; Nguyen, A. B.; Park, E.; Heffernan, L.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3908-3915. <https://doi.org/10.1021/ac050475e>
- Nemes, P.; Marginean, I.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3105-3116. <https://doi.org/10.1021/ac062382i>
- Nemes, P.; Goyal, S.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 387-395. <https://doi.org/10.1021/ac0714359>
- Marginean, I.; Nemes, P.; Vertes, A. *Physical Review E* **2007**, *76*, 026320. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.76.026320>
- Marginean, I.; Nemes, P.; Vertes, A. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 064502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.064502>
- Shrestha, B.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4308-4315. <https://doi.org/10.1021/ac500007t>
- Shrestha, B.; Zhang, L.; Vertes, A. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*.
- Nemes, P.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8098-8106. <https://doi.org/10.1021/ac071181r>

15. Nemes, P.; Barton, A. A.; Li, Y.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4575-4582.
<https://doi.org/10.1021/ac8004082>
16. Nemes, P.; Barton, A. A.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6668-6675.
<https://doi.org/10.1021/ac900745e>
17. Chen, Z.; Bogaerts, A.; Vertes, A. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*.
<https://doi.org/10.1063/1.2243961>
18. Chen, Z.; Vertes, A. *Physical Review E* **2008**, *77*.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.77.036316>
19. Taylor, G. I. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* **1950**, *201*, 159-174.
<https://doi.org/10.1098/rspa.1950.0049>
20. Taylor, G. I. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* **1950**, *201*, 175-186.
<https://doi.org/10.1098/rspa.1950.0050>
21. Shrestha, B.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8265-8271.
<https://doi.org/10.1021/ac901525g>
22. Shrestha, B.; Nemes, P.; Vertes, A. *Applied Physics a-Materials Science & Processing* **2010**, *101*, 121-126.
<https://doi.org/10.1007/s00339-010-5781-2>
23. Shrestha, B.; Vertes, A. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2010**.
<https://doi.org/10.3791/2144>
24. Shrestha, B.; Patt, J. M.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2947-2955.
<https://doi.org/10.1021/ac102958x>
25. Stopka, S. A.; Samarah, L. Z.; Shaw, J. B.; Liyu, A. V.; Velickovic, D.; Agtuca, B. J.; Kukolj, C.; Koppenaal, D. W.; Stacey, G.; Pasa-Tolic, L.; Anderton, C. R.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 5028-5035.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05084>
26. Samarah, L. Z.; Khattar, R.; Tran, T. H.; Stopka, S. A.; Brantner, C. A.; Parlanti, P.; Velickovic, D.; Shaw, J. B.; Agtuca, B. J.; Stacey, G.; Pasa-Tolic, L.; Tolic, N.; Anderton, C. R.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 7289-7298.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00936>
27. Dolatmoradi, M.; Stopka, S. A.; Corning, C.; Stacey, G.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 17741-17749.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03651>
28. Stopka, S. A.; Wood, E. A.; Khattar, R.; Agtuca, B. J.; Abdelmoula, W. M.; Agar, N. Y. R.; Stacey, G.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 9677-9687.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00569>
29. Walker, B. N.; Razunguzwa, T.; Powell, M.; Knochenmuss, R.; Vertes, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1669-1672.
<https://doi.org/10.1002/anie.200805114>
30. Walker, B. N.; Stolee, J. A.; Pickel, D. L.; Retterer, S. T.; Vertes, A. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 4835-4840.
<https://doi.org/10.1021/jp9110103>
31. Walker, B. N.; Stolee, J. A.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7756-7762.
<https://doi.org/10.1021/ac301238k>
32. Stolee, J. A.; Vertes, A. *PCCP* **2011**, *13*, 9140-9146.
<https://doi.org/10.1039/c0cp02709j>
33. Stolee, J. A.; Walker, B. N.; Zorba, V.; Russo, R. E.; Vertes, A. *PCCP* **2012**, *14*, 8453-8471.
<https://doi.org/10.1039/c2cp00038e>
34. Samarah, L. Z.; Vertes, A. *View* **2020**, *1*.
<https://doi.org/10.1002/VIW.20200063>
35. Samarah, L. Z.; Tran, T. H.; Stacey, G.; Vertes, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9071-9077.
<https://doi.org/10.1002/anie.202015251>
36. Vértés, Á. *Magy. Kem. Foly.* **2024**, *130*, 65-74.
<https://doi.org/10.24100/MKF.2024.01-02.65>

Cell explosion and nanophotonics for single cell metabolomics

During the past two decades, the molecular mapping of biological systems has undergone a profound methodological transformation, moving away from traditional population-based analyses toward technologies capable of single-cell resolution. While analyzing bulk samples composed of millions of cells has historically provided valuable foundational knowledge, this averaging approach carries a critical bias by entirely masking cellular heterogeneity. Within any tissue or culture, individual cells exist in vastly different metabolic, developmental, or functional states. Consequently, transitioning to single-cell analysis is not merely a minor technical refinement; it is an absolute necessity for understanding highly complex, heterogeneous biological phenomena, such as the emergence of rare, drug-resistant subpopulations in cancer or the nuanced trajectories of cellular differentiation.

Despite its clear biological importance, single-cell metabolomics faces extraordinary analytical challenges that do not affect other omics fields. Unlike genomics and transcriptomics, which rely on polymerase chain reaction amplification to detect scarce genetic material, metabolites cannot be amplified. Researchers must therefore work exclusively with the minute quantities present within a single cell. This challenge is compounded by the exceptionally small volumes involved, typically ranging from picoliters to femtoliters in mammalian and microbial cells, respectively, alongside an immense chemical diversity. The metabolome contains thousands of structurally distinct molecules, including lipids, amino acids, sugars, and organic acids, which possess widely varying polarities, molecular weights, and chemical stabilities. Furthermore, many critical signaling molecules exist in extremely low copy numbers, demanding detection methods of unprecedented sensitivity and selectivity.

To breach these physical and chemical barriers and capture cellular contents with minimal sample loss, we have championed innovative physical-chemical strategies centered on the concept of cell explosion induced by laser pulses. By utilizing finely focused mid-IR laser pulses the cell content is ejected, and the resulting plume is ionized by an electrospray. This newly introduced laser ablation electrospray ionization (LAESI) approach in combination with mass spectrometry (MS) has been used for single cell analysis in various biological systems. The underlying physics relies on laser-induced phase explosion and transient shockwaves. These processes govern plume dynamics that instantly eject the intracellular contents. This rapid transition occurs within milliseconds, preventing the ambient chemical degradation that typically plagues sampling of biological samples.

Automating the process of LAESI-MS analysis of tissue embedded single cells enabled the characterization of cellular heterogeneity. To characterize unimodal distributions of metabolite con-

centrations within a cell population, we introduced the concept of metabolic noise. It can be viewed as a measure of the tightness of the regulation of a particular metabolite level in a biological system. Detecting bi- and multimodal concentration distributions indicated the presence of subpopulations within the cellular assembly. This enabled us to identify coexistent metabolic states or hidden phenotypes, e.g., in nitrogen fixing root nodules of legumes.

Many of the metabolites in biological systems remain unidentified. These elusive species are collectively known as the “dark metabolome.” By combining LAESI-MS with a 21 T FT-ICR MS, we were able to capture multiple isotopic fine structures from single cells and determine the molecular formulas for heretofore unidentified metabolites. Exploring unknown metabolites in rare cells promises new insight into their biological function.

For single microbial cells, we further enhanced MS sensitivity by introducing highly efficient nanophotonic ionization. Traditional matrix-assisted laser desorption ionization relies on chemical matrices that produce overwhelming background noise in the low-mass range, which is precisely where the majority of key metabolites reside. To bypass this limitation, we developed silicon nanopost arrays (NAPA) as a matrix-free laser desorption ionization platform. NAPA structures consist of highly ordered, nanofabricated silicon nanoposts with diameters (~100 nm) and heights (~1000 nm) optimized for maximum ion yield. When a pulsed UV laser interacts with these nanophotonic structures, it triggers highly localized electromagnetic field enhancements, creating plasmonic-like hot spots alongside rapid evaporation of the sample from their surface. This light-matter interaction drives the highly efficient, intact desorption and ionization of cellular metabolites directly from the substrate, minimizing the molecular fragmentation that would otherwise obscure the data.

Looking to the future, these advanced single-cell ablation and nanophotonic ionization techniques are paving the way for spatial metabolomics and high-resolution tissue imaging. By coupling micro-sampling with MS, we can now map specific metabolic profiles directly onto their precise histological and spatial contexts within tissues. In clinical settings, this capability is invaluable for identifying rare, therapy-resistant cells within tumor microenvironments that drive cancer recurrence. As automated laser-based micro-sampling, sophisticated microfluidics, nanophotonic MS, and machine learning for data analysis continue to merge, this analytical paradigm shift will ultimately enable high-throughput, real-time clinical diagnostics at the single-cell level.