

На правах рукописи

Франкевич Владимир Евгеньевич

**РОЛЬ ИОНОВ, ЭЛЕКТРОНОВ И ФОТОНОВ В РАСШИРЕНИИ
АНАЛИТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН)

Защита состоится «__» _____ на заседании диссертационного советапо адресу 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национального исследовательского университета) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-fiziko-matematicheskie-nauki.php>

Работа представлена «__» _____ 202_ г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, доктора наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно-технической политике».

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Масс-спектрометрия (МС) — это физико-химический метод анализа веществ, позволяющий определять качественный и количественный состав образца на молекулярном уровне. Масс-спектрометрия является незаменимым аналитическим инструментом в химии, физике, биологии, медицине и многих других областях науки. Принцип метода основан на переводе молекул исследуемого образца в газообразное состояние с их последующей ионизацией и разделением ионов по величинам отношения массы к заряду. Ионизация высокомолекулярных соединений в неповрежденном виде является одной из проблем применения масс-спектрометрии в органической и биохимии. Многие стандартные методы ионизации, такие как электронная ионизация или лазерная десорбция, сообщают молекулам образца избыточную внутреннюю энергию, приводящую к разрыву внутримолекулярных связей и образованию большого количества фрагментов. Разработка так называемых «мягких» методов ионизации, таких как ионизация электрораспылением (ЭРИ) и матрично-активированная лазерная десорбция и ионизация (МАЛДИ), обеспечили научный прорыв в исследовании высокомолекулярных соединений. Эти методы позволили минимизировать избыточную внутреннюю энергию и решили сложную задачу образования газофазных ионов из больших и нелетучих биомолекул, таких как белки и пептиды, без их фрагментации. Однако фундаментальные процессы образования ионов в методе МАЛДИ и ЭРИ еще не до конца исследованы. Определение успешных и работающих экспериментальных протоколов происходит, в основном, эмпирически. Все модели или теории еще далеки от того, чтобы предсказывать возможный выход ионов. Понимание процессов, происходящих в МАЛДИ и ЭРИ, позволит значительно улучшить воспроизводимость результатов МС, увеличить выход ионов и контролировать их фрагментацию, а также найти новые аналитические приложения МС. Для успешной и продуктивной работы источников мягкой ионизации в масс-спектрометрии необходимо усовершенствование и модификация самих МС приборов, что невозможно без понимания процессов образования ионов и изучения динамики их движения во всех частях масс-спектрометра. Таким образом, конструирование специальных ячеек и ловушек, построенных под конкретные источники ионизации и предназначенных для эффективного удержания и детектирования ионов, является более чем актуальной задачей. Разработка неразрушающих методов детектирования ионов — это новое и перспективное направление. Ряд современных масс-спектрометров использует метод регистрации ионов по наведенному ими сигналу на детектор. Это позволяет достичь рекордного значения разрешающей способности приборов при работе с любыми источниками ионизации.

Фундаментальная проблема масс-спектрометрии заключается в правомерности ее использования для исследования макромолекул, первоначально находящихся в жидкой фазе. Дело в том, что до сих пор окончательно не решен вопрос, сохраняет ли макромолекула нативную

конформацию при ее ионизации и переводе в газовую фазу. Возможность получения комплиментарной оптической информации о газофазных ионах в масс-спектрометре позволило бы дать ответ о конформационной целостности молекул, произведенных мягкими методами ионизации.

На сегодняшний день масс-спектрометрия нашла широкое применение в медицинских исследованиях и рутинной клинической диагностике. Такие области исследований, как эндокринология, идентификация микроорганизмов, лекарственный мониторинг, диагностика заболеваний по анализу выдыхаемого воздуха, трудно представить без масс-спектрометрии. МС показывает свой высокий потенциал и в таких направлениях клинических исследований, как анализ биологических тканей в режиме реального времени. Необходимо доказать роль методов прямой МС, как наиболее эффективного аналитического инструмента в диагностике и лечении заболеваний, с помощью реальных клинических исследований. Определение возможностей прямой масс-спектрометрии в быстрой и точной идентификации злокачественных тканей, в том числе в режиме реального времени, является в настоящее время особенно актуальной задачей.

Целью диссертационной работы является изучение роли электронов, оптических свойств и динамики газофазных ионов для расширения аналитических возможностей масс-спектрометрии; разработка новой инструментальной базы масс-спектрометрии высокого разрешения, включающей гибридные инструменты, с комплементарными методами анализа, позволяющими не только проводить измерения массы ионов, но и изучать оптические свойства молекул в газовой фазе; а также проверка разработанных методов в реальной клинической практике для диагностических целей и определении новых стратегий лечения.

Для достижения поставленной цели были **поставлены и решены следующие задачи:**

1. Исследовать механизмы образования ионов в мягких методах ионизации, таких как МАЛДИ и ЭРИ.
2. Изучить природу и роль свободных электронов в масс-спектрометрии с методом ионизации МАЛДИ.
3. Изучить динамику ионов в электромагнитных полях для создания новых эффективных ловушек захвата ионов в спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ) и создания нового типа масс-спектрометра с неразрушающим детектированием ионов на основе квадрупольной ловушки.
4. Исследовать оптические свойства как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений в газовой фазе с целью проверки правомерности использования масс-спектрометрии для изучения характеристик макромолекул, а также для изучения структуры молекул в газовой фазе.

5. Изучить процессы, происходящие внутри облака ЭРИ, для доказательства возможности получения газофазных ионов при атмосферном давлении.
6. Проанализировать возможность изучения флуоресцентного резонансного переноса энергии в газовой фазе с целью определения структуры молекул.
7. Разработать гибридный инструмент на основе методов анализа ионной подвижности и лазерной индуцированной флуоресценции (ЛИФ).
8. Проверить эффективность разработанных методов при анализе клинических образцов для поиска биомаркеров различных гинекологических заболеваний, а также эффективность использования разработанных методов в режиме реального времени для диагностики и лечения онкологических заболеваний.

Научная новизна:

1. Впервые обнаружены свободные электроны и экспериментально доказана их роль в процессах МАЛДИ. Открытие свободных электронов, генерируемых в методе МАЛДИ, позволило выдвинуть экспериментально обоснованные гипотезы, объясняющие ряд существенных явлений, характерных для этого метода, например, образование преимущественно однозарядных ионов.
2. Впервые показано, что ионы в методе МАЛДИ образуются через несколько микросекунд после лазерного импульса, в начальный же момент в облаке МАЛДИ присутствуют тяжелые заряженные кластеры. Уникальные эксперименты по измерению начальных скоростей ионов в методе МАЛДИ показали, какие из существующих механизмов образования ионов наиболее вероятны.
3. Разработан новый тип масс-спектрометра, который позволяет проводить широкополосное неразрушающее детектирование ионов в квадрупольной ионной ловушке.
4. Разработана новая конструкция ячейки ИЦР ПФ, которая позволила объединить преимущества внутренних и внешних источников МАЛДИ в одном приборе. Впервые продемонстрирован динамический захват ионов в открытой ячейке ИЦР ПФ, который открыл новые возможности для манипуляций с ионным облаком для расширения возможностей масс-спектрометрии ИЦР ПФ.
5. Показана возможность получения сигнала ЛИФ от газофазных ионов в спектрометре ИЦР ПФ с внутренним источником МАЛДИ и источником ЭРИ. На примере ионов родамина показана важность изучения оптических свойств молекул в газовой фазе.
6. Обнаружен флуоресцентный резонансный перенос энергии в молекулах в газовой фазе и изучены его свойства.
7. Изучен вопрос существования биологических молекул в нативной конформации в газовой фазе при атмосферном давлении и в вакууме. Выполнена фундаментальная работа по изучению флуоресценции зеленого флуоресцентного белка в газовой фазе. Показано, что ЭРИ не является тем методом, который может легко перенести любую биомолекулу в газовую фазу в ее естественном виде.

8. Обнаружены высокие концентрации десольватированных ионов внутри облака ЭРИ при атмосферном давлении, что существенно расширяет экспериментальный арсенал для исследования свойств этих ионов.
9. Разработан и создан новый прибор на основе метода ЛИФ и дифференциального анализатора подвижности ионов. Учитывая, что как структура молекулы, так и ее флуоресценция являются ключевыми свойствами молекул в газовой фазе, ожидается, что новый гибридный инструмент будет иметь потенциал для решения многих аналитических задач.
10. Проведены исследования механизмов ионизации при атмосферном давлении с помощью метода ЛИФ.
11. Впервые проведено детальное исследование эндометриоза различной локализации методами прямой масс-спектрометрии.
12. Показано, что методы прямой МС могут быть использованы для диагностических целей и разработки новых стратегий лечения.
13. Показана эффективность использования метода ЭРИ с ткани для идентификации раковых тканей. Доказаны возможности прямой масс-спектрометрии в быстрой и точной идентификации злокачественных тканей.
14. Создана уникальная система «умный нож» для диагностики и контроля лечения онкологических заболеваний на основе методов прямой масс-спектрометрии.

Практическая значимость:

1. Разработан новый тип масс-спектрометра, готовый к коммерческому использованию.
2. Созданы новые типы ловушек спектрометра ИЦР, использующиеся в современных приборах.
3. Сформулирована концепция образования свободных электронов в методе МАЛДИ, которая легла в основу создания новых типов подложек и матриц.
4. Выполнено внедрение разработанной концепции объединения метода ЛИФ и спектрометра ИЦР ПФ, включая уникальные оптические ячейки ИЦР, в рутинную работу нескольких лабораторий мира.
5. Экспериментально подтвержденная теория сохранения нативной структуры молекул в газовой фазе расширила возможности использования масс-спектрометрии для исследования биомолекул.
6. Разработан и создан новый прибор на основе метода ЛИФ и дифференциального анализатора подвижности ионов. Новый гибридный инструмент имеет высокий потенциал для использования в научных лабораториях для исследования свойств газофазных ионов.
7. Разработаны панели биомаркеров для неинвазивной диагностики таких заболеваний, как эндометриоз и миома матки.
8. Разработанный прототип масс-спектрометра «умный нож» подготовлен к использованию в учреждениях Минздрава России.

Автор выносит на защиту следующие основные положения:

1. Новую научную концепцию механизмов образования ионов в методе МАЛДИ, основанную на количественном определении свободных электронов. С помощью данной концепции можно контролировать выход электронов и таким образом контролировать выход положительных ионов, в том числе многозарядных; новый метод определения энергий и скоростей ионов в методе МАЛДИ, который может быть использован как для более эффективного детектирования ионов, так и для объяснения механизмов их образования; представлены экспериментальные доказательства того, что ионы МАЛДИ образуются через несколько микросекунд после выстрела лазера, в начальный же момент в облаке присутствуют тяжелые заряженные кластеры.
2. Новые конструктивные модели ионных ловушек для эффективного удержания и детектирования ионов, построенные под конкретные источники ионизации, в том числе оригинальный метод неразрушающего детектирования ионов в квадрупольной масс-спектрометрии, основанный на измерении наведенного тока пакетом ионов, предварительно возбужденном в аксиальной плоскости квадрупольной ловушки.
3. Новую ионно-оптическую систему на базе масс-спектрометра ИЦР ПФ, позволяющую получать как масс-спектры высокого разрешения, так и сигналы лазерно-индуцированной флуоресценции. На примере ионов родамина показана важность изучения оптических свойств молекул в газовой фазе, продемонстрирована возможность детектирования флуоресцентного резонансного переноса энергии в ионах в газовой фазе для изучения структур молекул.
4. Новую концепцию существования биологических молекул в нативной конформации в газовой фазе и в вакууме. На основе изучения зеленого флуоресцентного белка в газовой фазе впервые описаны потенциальные ограничения использования метода ЭРИ для переноса биомолекул в газовую фазу в нативной форме. Получено экспериментальное доказательство наличия высоких концентраций газообразных ионов внутри облака ЭРИ в условиях окружающей среды.
5. Новый прибор на основе комбинации метода ЛИФ и дифференциального анализатора подвижности ионов, являющийся гибридным инструментом для решения многих задач химической физики.
6. Новый метод диагностики заболеваний по молекулярному профилю тканей и биологических жидкостей, в том числе в режиме реального времени, методом прямой масс-спектрометрии.

Апробация диссертационной работы: Данная работа была выполнена в университете Пердью (Индиана, США), Швейцарском федеральном техническом институте (Цюрих, Швейцария) и в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» в течении 1995–2020 гг.

Основные результаты были представлены на 1, 6 и 7 европейской школе-семинаре по спектрометрии ионного циклотронного резонанса (Bielefeld 2001,

Kerkrade 2001, Konstanz 2004); 42–65 конференциях по масс-спектрометрии американского масс-спектрометрического общества (США, 1995–2018); 15, 16, 19 и 22 международных масс-спектрометрических конференциях (2000, 2004, 2010, 2018); 1 и 2 школе-семинаре «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии» (Звенигород, 2002, 2004); Первом, втором, третьем, шестом и седьмом съездах Всероссийского масс-спектрометрического общества (Москва, 2003–2015); международной конференции «Десорбция 2004», (Санкт-Петербург, 2004); 4 американской конференции по спектрометрии ИЦР (Сан-Франциско, США, 2003); конференциях по масс-спектрометрии швейцарского масс-спектрометрического общества (Швейцария, 2000–2014); конференции по масс-спектрометрии в клинической практике (Зальцбург, 2014, 2016, 2017, 2019); форуме «Мать и Дитя» (Москва, 2014–2019); конгрессе федерации лабораторной медицины (Москва, 2018–2020); конгрессе по лабораторной диагностике (Москва, 2019–2020).

По теме диссертации сделаны 44 публикации, в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора

Основные результаты работы получены при непосредственном участии автора, при его прямом руководстве либо консультациях. Личный вклад автора состоит в разработке новой научной концепции механизмов образования ионов в методе МАЛДИ, основанной на количественном анализе свойств свободных электронов, сгенерированных на границе раздела между матрицей и подложкой в процессе ионизации; выработке целей и постановке задач исследований; участии в исследованиях и разработках на всех этапах процесса; участии в апробации результатов исследования; разработке способа определения энергий и скоростей ионов в методе МАЛДИ; предложении и реализации оригинального метода неразрушающего детектирования ионов в квадрупольном масс-спектрометре, что впоследствии привело к получению патента; создании нескольких ловушек спектрометра ИЦР, в том числе нескольких оптических ловушек ИЦР; самостоятельном получении как оптических, так и масс-спектров, которые были использованы во многих экспериментах; имплементации метода лазерно-индуцированной флуоресценции на спектрометре ИЦР с источниками МАЛДИ и ЭРИ; разработке новой концепции существования биомолекул в нативной конформации в газовой фазе и концепции наличия газофазных ионов в облаке ЭРИ, а также предложения по их исследованию с помощью ЛИФ; разработке и создании комбинированного прибора, сочетающего преимущества ЛИФ и спектрометра ионной подвижности; реализации в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» проекта по неинвазивной диагностике гинекологических заболеваний методами прямой масс-спектрометрии; внедрении в клиническую практику новых методов профилирования тканей, в том числе раковых тканей; разработке действующих образцов приборов с улучшенными аналитическими характеристиками; разработке методов обработки и регистрации данных; подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Структура диссертации: Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав и заключения. Работа имеет 391 страницу текста, включая 167 рисунков. Библиография насчитывает 374 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Диссертационная работа начинается с обсуждения роли МС в современном мире. Дается обзор методов ионизации и методов детектирования в МС. Показано, что данные методы широко используются в настоящее время в большинстве коммерческих масс-спектрометров, однако механизмы, лежащие в основе их работы, еще не до конца изучены. Кратко описаны основные механизмы образования ионов в методах ЭРИ и МАЛДИ. В МАЛДИ ионы образуются при взаимодействии лазерного излучения с кристаллом образца-матрицы. Это приводит к поглощению энергии лазера матрицей и последующей десорбции, а также ионизации. Обсуждаются несколько основных теорий, описывающих процессы образования ионов, модель протонирования молекул матрицы, модель «счастливого выживших ионов». Приводятся факты, свидетельствующие в пользу одной из указанных моделей.

В настоящее время в МС широко используются четыре основных типа масс-анализаторов, а именно: квадрупольный, квадрупольная ионная ловушка, времяпролетный, а также анализатор, основанный на ионном циклотронном резонансе с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ). В деталях описаны два типа масс-анализаторов: квадрупольные ионные ловушки и МС ИЦР ПФ, использующие электродинамический захват ионов. Показана важность разработки новых типов ловушек как для квадрупольной МС, так и для МС ИЦР ПФ.

Одним из приложений для электродинамического захвата ионов является ионная спектроскопия. Обосновывается важность изучения оптических свойств газофазных ионов как способа получения комплементарной информации о молекуле. Спектроскопия молекулярных ионов в газовой фазе или вакууме является областью интенсивных исследований, посвященных выявлению их внутренней электронной структуры в отсутствие возмущений от сольватной оболочки. Показаны трудности, связанные со спектроскопическими исследованиями ионов в газовой фазе и вакууме и необходимость разработки специальных оптических ловушек, которые комбинируют в себе качества как ионной ловушки, так и оптической системы, которая может сфокусировать испускаемые ионами фотоны и оправить их на детектор.

Показана роль масс-спектрометрии в клинических лабораториях. Дан обзор приложений, в которых используются технологии масс-спектрометрии для скрининга и диагностики заболеваний, терапевтического мониторинга лекарственных препаратов и для поиска новых биомаркеров различных патологий. Обосновывается необходимость усовершенствования аналитических возможностей масс-спектрометрического оборудования. Одним из новых

направлений использования масс-спектрометрии является онлайн-диагностика заболеваний. Описываются современные методы интраоперационной оценки опухолей методами масс-спектрометрии.

Глава 2. Данная глава посвящена изучению механизмов образования ионов в методе МАЛДИ. Были проведены уникальные эксперименты на МС ИЦР ПФ с внутренним источником МАЛДИ по измерению начальных скоростей ионов в МАЛДИ. Основное положение, которое было доказано данными экспериментами, — зависимость скорости ионов от их массы (Рис.1).

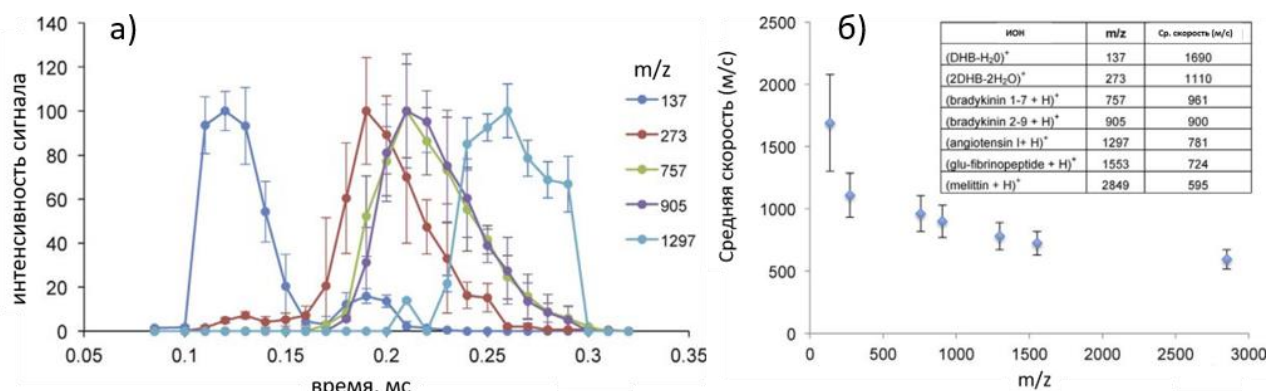


Рис.1. Время прибытия ионов различной массы, образованных в источнике МАЛДИ, в ячейку ИЦР (а). Средняя скорость ионов в зависимости от массы (б)

Многие предложенные ранее модели МАЛДИ противоречат экспериментально наблюдаемым фактам. Например, согласно модели идеальной струи скорость ионов, генерируемых в МАЛДИ, не должна зависеть от массы. Полученные результаты о зависимости скорости ионов от массы не подтверждают и тепловую модель пучка эффузивных частиц, согласно которой кинетические энергии ионов не зависят от массы. Напротив, увеличение кинетической энергии для более тяжелых пептидов наблюдается с увеличением молекулярной массы, что подтверждает ранее опубликованные данные.

Был изучен вопрос времени и характера образования ионов в процессе МАЛДИ. Образуются ли ионы внутри матрицы, на поверхности мишени или позднее, уже в облаке, за счет ионно-молекулярных реакций? Двумя независимыми экспериментами на модифицированной ячейке спектрометра ИЦР ПФ показано, что ионы в МАЛДИ образуются через несколько микросекунд после выстрела лазера. В начальный же момент в облаке присутствуют тяжелые заряженные кластеры. Данные кластеры были зарегистрированы в эксперименте на спектрометре ИЦР ПФ. Было показано, что распад кластеров позднее приводит к возникновению молекулярных ионов.

Предложен оригинальный метод измерения температуры в облаке МАЛДИ. При облучении органических кристаллов импульсами ультрафиолетового лазера электронно-возбужденные молекулы обмениваются колебательной энергией и/или переносят ее в окружающую среду с периодом полураспада порядка пикосекунд. Поглощенная тепловая энергия вызывает повышение температуры твердого тела. Из-за низкой теплопроводности твердых

органических веществ при использовании стандартных наносекундных лазерных импульсов могут быть достигнуты значительные изменения температуры в области ионизации. Высокая температура системы может играть ключевую роль в различных процессах МАЛДИ, которые происходят после поглощения энергии лазера. Были проведены временные измерения температуры поверхности для различных матриц МАЛДИ. Обнаружено, что для 2,5-DHB и никотиновой кислоты максимальная температура поверхности находится в диапазоне от 850 до 1100 К, в зависимости от толщины образца и интенсивности лазерного излучения. Показано, что испарительное охлаждение работает для всех исследованных матриц во время лазерного импульса и в значительной степени контролирует достигнутые пиковые температуры. Полученные данные могут быть использованы для моделирования процессов, происходящих в облаке МАЛДИ. Они также показывают, что термоионизация не играет главной роли в процессе образования ионов в методе МАЛДИ.

В процессе МАЛДИ образуются положительные и отрицательные ионы, нейтральные молекулы и электроны. Происхождение электронов было изучено не до конца. Химические реакции электронов в облаке МАЛДИ также представляют интерес. В МАЛДИ все ионы имеют определенную начальную скорость и могут быть захвачены в ячейке ИЦР после соответствующего времени пролета. При отрицательном потенциале электродов ловушки ИЦР в ней могут быть захвачены отрицательные ионы и электроны. Однако электроны не могут быть обнаружены и измерены непосредственно в спектрометре ИЦР из-за их низкой массы и высокой циклотронной частоты. Ожидалось, что электроны будут иметь гораздо более высокую скорость, чем ионы, и могут быть заперты ячейкой ИЦР при более коротком времени захвата. Для проверки наличия электронов в ячейке в вакуумную систему был добавлен газ SF_6 (Рис.2). Гексафторид серы имеет высокое ($1 \times 10^{-15} \text{ см}^2$) поперечное сечение для захвата электронов низкой энергии.

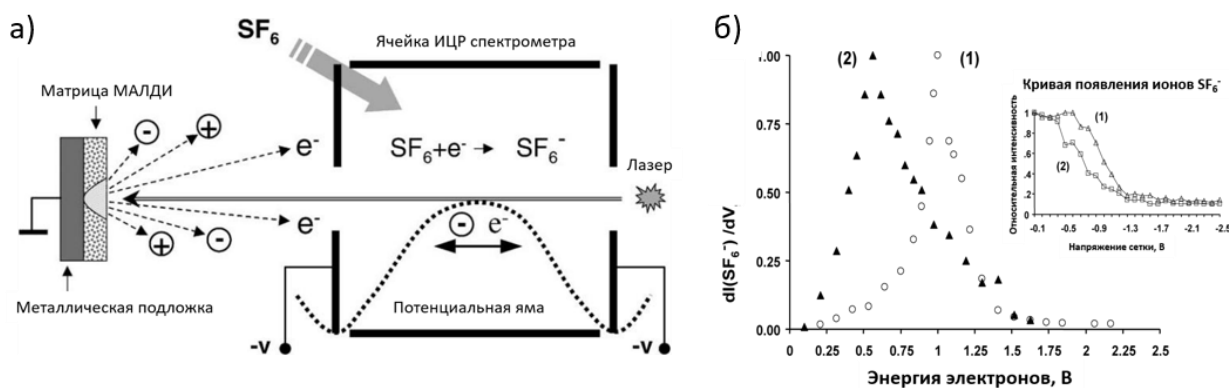


Рис.2. Схема детектирования свободных электронов в методе МАЛДИ (а). Распределение энергии электронов в МАЛДИ. (1) подложка из нержавеющей стали; (2) подложка из золота (б). Вставка на рисунке (б) показывает кривые появления ионов SF_6^-

Газ SF_6 добавляли в вакуумную систему через импульсный электромагнитный клапан после того, как электроны были захвачены в ячейку ИЦР. Спектры на Рис.3 показывают сигнал ионов SF_6^- при разном времени захвата.

Образец представлял собой матрицу DHB, приготовленную методом высушенной капли, на мишени из нержавеющей стали («тонкий» образец). При времени задержки 10 мс наблюдался интенсивный сигнал ионов SF_6^- , что доказывает наличие большого числа электронов в облаке МАЛДИ. Открытие большого количества свободных электронов, генерируемых в МАЛДИ, позволило выдвинуть гипотезы, объясняющие ряд наблюдаемых ранее явлений, таких как образование отрицательных ионов путем захвата электронов, преобладание однозарядных ионов в МАЛДИ и многие другие.

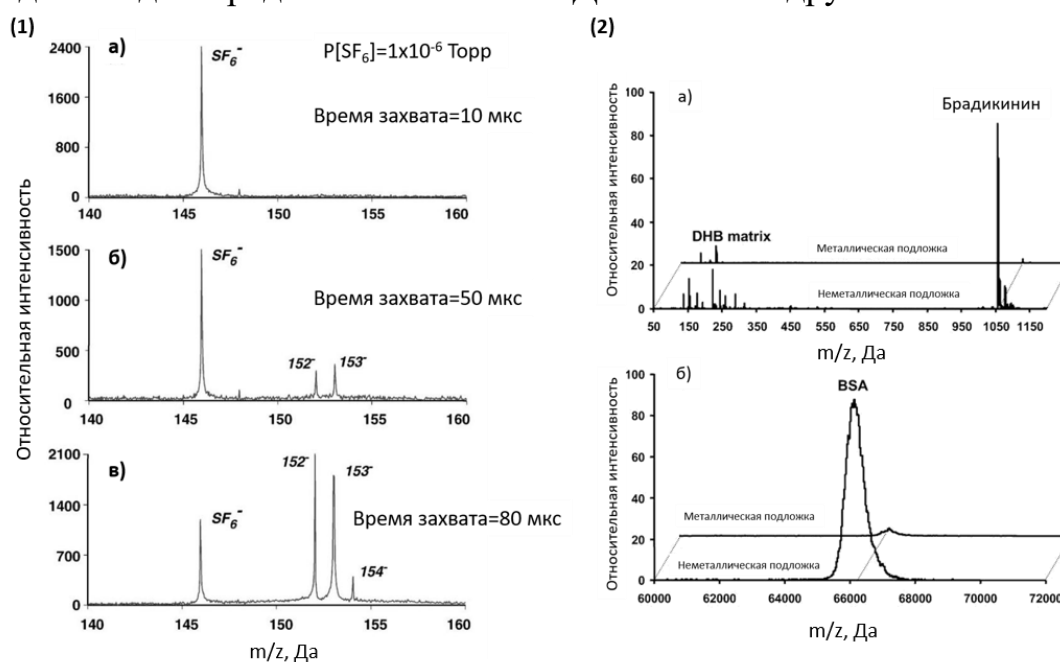


Рис. 3. Масс-спектр ионов SF_6^- и отрицательных ионов матрицы DHB при различном времени захвата (времени пролета) (1). МАЛДИ масс-спектры положительных ионов, полученные на времяпролетном МС (2): (а) брадикинин (1060 Да) и (б) BSA (66 кДа), полученный в линейном режиме с отложенной экстракцией ионов с использованием матрицы DHB, с подложкой из нержавеющей стали (дальний спектр на рисунке) и подложкой, покрытой кусочком ленты скотча (ближний спектр на рисунке)

Было обнаружено, что интенсивная электронная эмиссия может возникать под действием лазерного излучения из металлической подложки, только когда она покрыта тонким слоем матрицы. Выход электронов сильно зависит от толщины матрицы. Был предложен метод измерения энергии электронов (Рис.2 (б)). Также было показано, что выход электронов имеет максимум при очень малой толщине матрицы (и уменьшается при увеличении ее толщины). Возможное объяснение этого эффекта состоит в том, что поверхность раздела металл/органика имеет более низкую работу выхода, нежели чистый металл.

Была предложена простая модель взаимодействия электронов с молекулами и ионами матрицы и образца, присутствующими в облаке МАЛДИ. Основная идея заключается в том, что наиболее вероятной реакцией с электронами низкой энергии является образование матричных анионов и атомов водорода. Установлено, какие экспериментальные параметры МАЛДИ влияют на выход многозарядных ионов, а также показано, что электроны и анионы, присутствующие в облаке МАЛДИ, способствуют нейтрализации катионов. Показано значительное увеличение сигнала положительных ионов образца в отсутствии электронов (Рис.3 (2)).

Исследовано влияние кинетической энергии электронов на процессы образования ионов в методе МАЛДИ. Показано, что только электроны с определенной кинетической энергией ответственны за уменьшение сигнала положительных ионов. Предложен практический способ контроля энергии электронов в эксперименте МАЛДИ. Показано влияние давления буферного газа на процессы ионизации в МАЛДИ. В ходе исследований наблюдалось значительное увеличение сигнала положительных ионов в МАЛДИ при повышении давления в области мишени. Увеличение сигнала связано с уменьшением числа отрицательных ионов в облаке МАЛДИ и уменьшением фрагментации ионов. Столкновения электронов с молекулами буферного газа приводят к уменьшению энергии электронов и снижению скорости реакции диссоциативного захвата электронов с образованием отрицательных ионов. Было также изучено влияние электронов на химические реакции в облаке МАЛДИ на примере восстановления Cu(II) . Одно из заметных явлений МАЛДИ — преобладание однозарядных ионов. Найдена причина, по которой аддукты ионов многовалентных металлов детектируются как однозарядные квазимолекулярные ионы. Экспериментально показано, что Cu(II) восстанавливается в отсутствие свободных электронов путем газофазной перезарядки с молекулами матрицы. Доказано, что захват свободных электронов является доминирующим механизмом восстановления Cu(II) при условии, что в облаке МАЛДИ имеется достаточно свободных электронов. При этом было дано объяснение хорошо известной особенности МАЛДИ — такой как плохая воспроизводимость интенсивностей ионов. Относительно толстый матричный слой или большой кристалл на поверхности могут легко блокировать источник свободных электронов, полностью видоизменяя масс-спектр. Предложено использовать специальные присадки к матрице, такие как CuCl_2 , хорошо поглощающие электроны, для увеличения сигнала положительных ионов.

Глава 3. Посвящена изучению динамики ионов в ловушках МС ИЦР ПФ и квадрупольных ионных ловушках. Представлена новая конструкция ячейки МС ИЦР ПФ, основанная на открытой конфигурации электродов. Она была создана с целью улучшения характеристик установки ИЦР ПФ при работе с внутренним источником МАЛДИ (Рис.4). Внедрение данной конструкции в МС ИЦР позволило объединить преимущества внутренних и внешних источников МАЛДИ в одном приборе. Новая конструкция ячейки ИЦР использует дополнительный кольцевой электрод, размещенный между источником ионов и

ячейкой ИЦР. Данный электрод служит для фокусировки ионов с широким распределением радиальных скоростей, накопления ионов и нивелированием других недостатков внутреннего источника МАЛДИ МС ИЦР ПФ. Впервые продемонстрирован динамический захват ионов в данной открытой ячейке МС ИЦР ПФ. Показано, что все возможности и преимущества открытых ячеек сохранены. И при этом было продемонстрировано несколько новых особенностей динамического захвата ионов в открытой ячейке, включая одновременный захват как положительных, так и отрицательных ионов, что дает дополнительные возможности для изучения ион-ионных и ионно-молекулярных реакций в МС ИЦР ПФ. Разработан и экспериментально проверен новый способ замедления высокоэнергичных ионов в МС ИЦР ПФ с внутренним источником МАЛДИ. Данный способ не включает никаких модификаций существующей ячейки ИЦР (Рис.4 (1)), программного обеспечения или коммерческой электроники. В методе используется замедление ионов в переднем цилиндре открытой ячейки спектрометра ИЦР. Было продемонстрировано несколько новых функций, которые должны послужить расширению возможностей МС ИЦР ПФ с внутренним источником МАЛДИ, включая плавное замедление ионов, эффективное замедление ионов в широком диапазоне масс и энергий, захват ионов с большой массой и возможность уменьшения ширины распределения кинетической энергии ионов, образованных в источнике МАЛДИ. На рис.4 (2) показан спектр белка бычьего сывороточного альбумина, впервые зарегистрированного с использованием внутреннего источника МАЛДИ и модифицированной ловушки. Данные разработки новых ловушек ИЦР позволили использовать масс-спектрометрию ИЦР, в том числе с внутренними источниками МАЛДИ, для анализа высокомолекулярных соединений, что в настоящее время является одной из приоритетных задач в биологии и медицине.

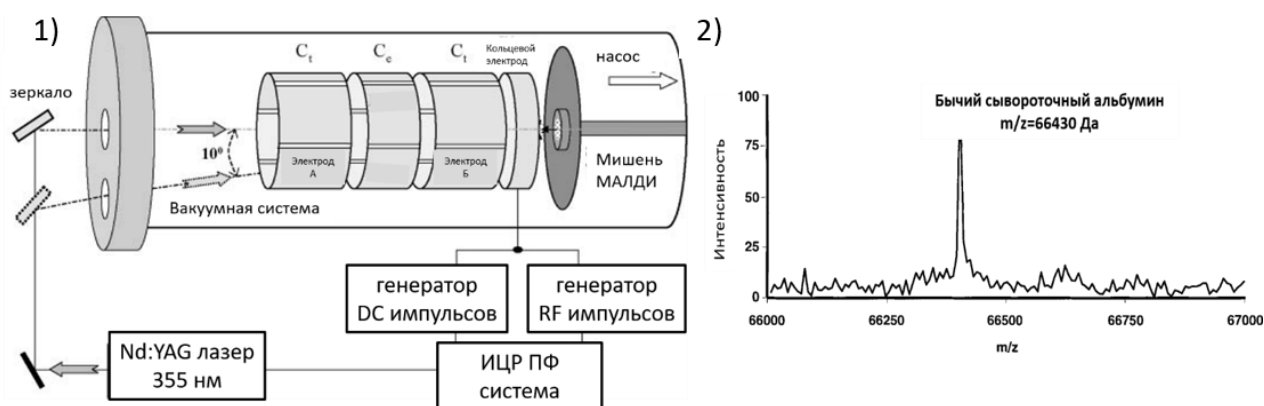


Рис.4. Открытая ловушка ИЦР с дополнительным кольцевым электродом (1). Масс-спектр БСА, полученный на МС ИЦР ПФ с внутренним источником МАЛДИ (2)

Различные типы ловушек, разработанные и изготовленные автором работы представлены на рис. 5.

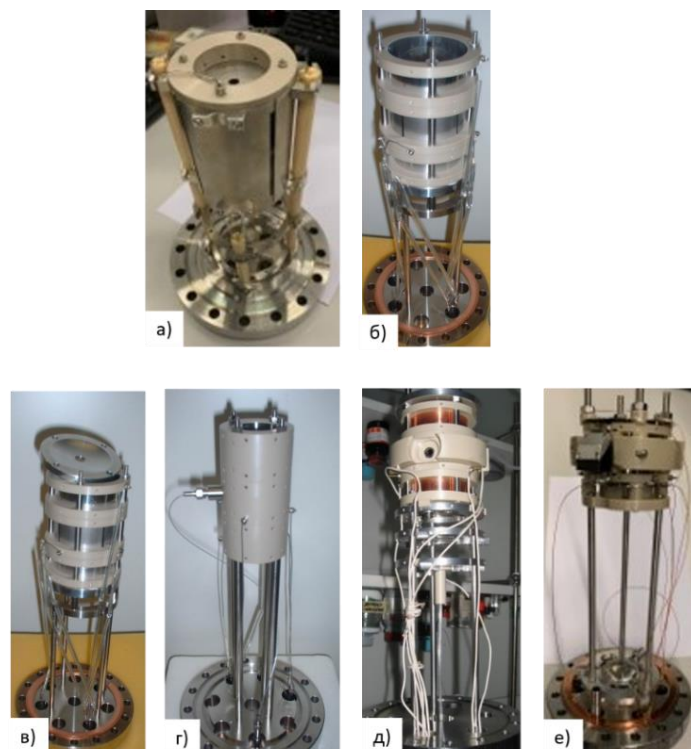


Рис.5. Ячейки ИЦР для различных аналитических приложений. Закрытая цилиндрическая ячейка (а); открытая ловушка ИЦР с дополнительным кольцевым электродом (б); ловушки ИЦР для ЛИФ-МС (в-д); комбинированная ловушка ИЦР, используемая в лаборатории в настоящее время (е)

В настоящей работе был впервые продемонстрирован новый подход, который позволяет проводить широкополосное неразрушающее детектирование ионов в квадрупольном МС с ионной ловушкой. Важным нововведением стало использование дополнительного электрода, встроенного в один из торцевых электродов ионной ловушки и выполняющего функцию антенны для приема наведенных колеблющимися ионами токов (Рис.6). Практическим преимуществом конструкции является физическое отделение электрода детектора от торцевого электрода, что обеспечивает временную и пространственную изоляцию источника ВЧ поля от цепи детектора.

Впервые показана возможность широкополосного неразрушающего детектирования ионов с использованием преобразования Фурье в масс-спектрометре с ионной ловушкой (Рис.6 (3,4)), а также возможность измерения наведенного тока с помощью относительно простой схемы детектирования, состоящей из предусилителя, фильтра и усилителя. Данная разработка положила начало развитию нового направления в масс-спектрометрии ионных ловушек. При этом разработанные процедуры возбуждения и детектирования ионов используются и в настоящее время.

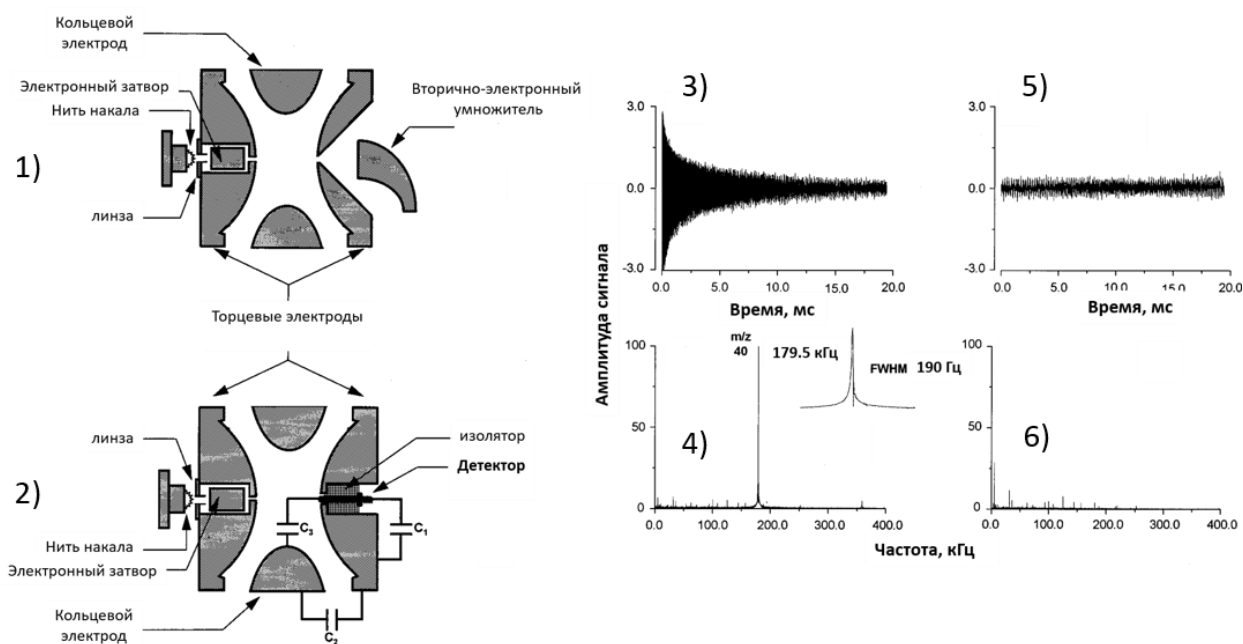


Рис.6. Стандартная конфигурация квадрупольной ионной ловушки с двумя торцевыми электродами, кольцевым электродом, источником ЭИ и внешним детектором (1). Модифицированная ловушка с дополнительным электродом, встроенным в один из торцевых электродов (2). Неразрушающее детектирование ионов аргона в квадрупольной ионной ловушке. Временной сигнал в присутствии (3) и отсутствии (5) ионов аргона. Соответствующие Фурье преобразования временных сигналов (4, 6)

Глава 4. Посвящена изучению оптических свойств ионов в газовой фазе. Показано, что сочетание лазерной индуцированной флуоресценции (ЛИФ) с масс-спектрометрией открывает новые возможности для структурных исследований ионов в газовой фазе. В настоящей работе представлено несколько схем измерений ЛИФ ионов, захваченных внутри МС ИЦР ПФ. Все они основаны на открытой конструкции ячейки ИЦР, непрерывном возбуждении флуоресценции ионов и различных схемах сбора фотонов с помощью волоконной оптики. В первых работах ионы родамина 6G использовались для разработки и тестирования установки, и была показана возможность получения сигнала ЛИФ от газофазных ионов в спектрометре ИЦР ПФ с внутренним источником МАЛДИ (рис.7 (1)). Впервые была разработана технология томографического ионного эксперимента по детектированию ионов родамина. Были проведены работы по исследованию продуктов фотодиссоциации ионов, наличие которых указывает на эффективность оптического возбуждения ионов. На первой установке ЛИФ-ИЦР ПФ была показана возможность флуоресцентного резонансного переноса энергии (ФРПЭ) в ионах в газовой фазе. ФРПЭ является чувствительным к расстоянию методом, который коррелирует изменения интенсивности флуоресценции с изменениями расстояния и ориентации конкретных спектроскопически активных фрагментов.

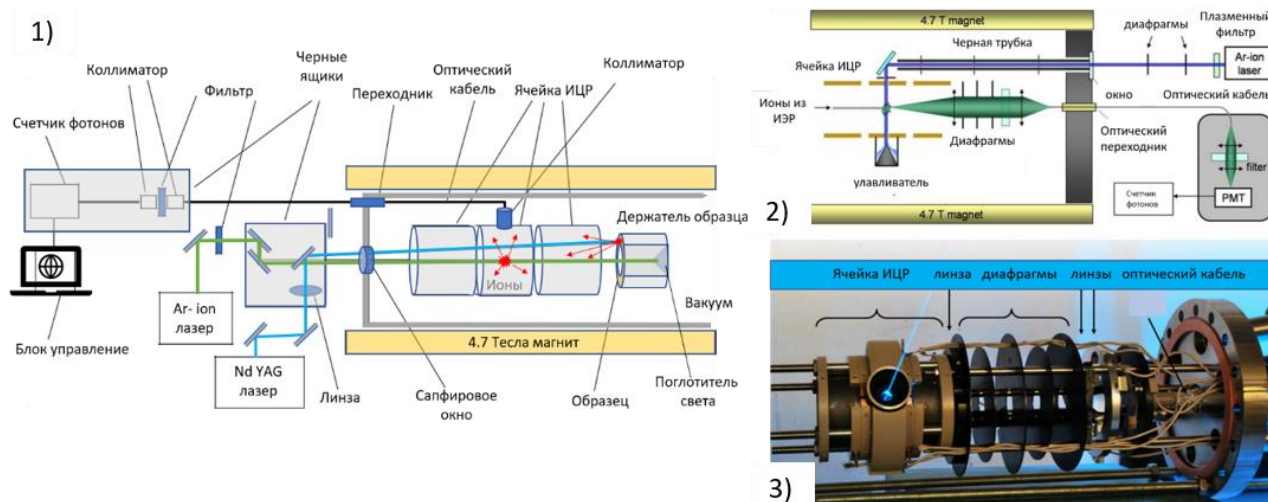


Рис.7. Схема установки для изучения оптических свойств газофазных ионов на основе комбинации метода ЛИФ и масс-спектрометра ИЦР ПФ с внутренним источником МАЛДИ (1). Экспериментальная установка ЛИФ-ИЦР ПФ с источником ЭРИ (2). Оптическая ячейка ИЦР во время процедуры выравнивания лазерного луча (3)

Было обнаружено, что некоторые красители, которые флуоресцируют в растворе, слабо флуоресцируют или не флуоресцируют в газовой фазе. Выяснена причина, почему происходит такая дискриминация по флуоресценции в растворе и газовой фазе. Также были обнаружены значительные сдвиги длин волн поглощения и излучения молекул при переходе от раствора к газовой фазе. Найдена подходящая пара для первых экспериментов ФРПЭ в газовой фазе. Для этого выбран родамин 6G, ковалентно связанный через жесткий линкер с сульфородамином В. Были исследованы и описаны несколько соединений и установлена корреляция между флуоресценцией в жидкой и газовой фазе. Обнаружен значительный сдвиг в спектрах поглощения и эмиссии родамина 6G и сульфородамина В в газовой фазе по отношению к раствору. Было дано объяснение влияния буферного газа на выход флуоресценции захваченных ионов родамина 6G. Доказано, что причиной этого явления стал внешний эффект тяжелого атома, проявляющийся при столкновениях ионов с молекулами буферного газа.

Следующее поколение комбинированного прибора ЛИФ со спектрометром ИЦР ПФ было построено для источника ЭРИ. На этом приборе выполнено большое количество экспериментов и продолжает выполняться в настоящие дни. Схема прибора показана на рис.7(2).

На примере ионов родамина показана важность изучения оптических свойств молекул в газовой фазе. Предложено несколько механизмов внутримолекулярной релаксации в ионах родамина (Рис.8). Исследовано влияние температуры молекул на их оптические свойства. Был сделан вывод, что внутренняя энергия протонированных молекул родамина 19 ($R19H^+$) в облаке ЭРИ не изменяется под воздействием лазерного излучения, что связано как с

низкой лазерной плотностью, так и с эффективным охлаждением ионов за счет столкновений с молекулами окружающего воздуха. Небольшое смещение спектра флуоресценции в сторону более длинных волн можно было наблюдать по мере увеличения мощности возбуждающего лазера, что отражает повышение температуры ионов внутри ячейки ИЦР во время измерения спектров ЛИФ (Рис.8 (2)).

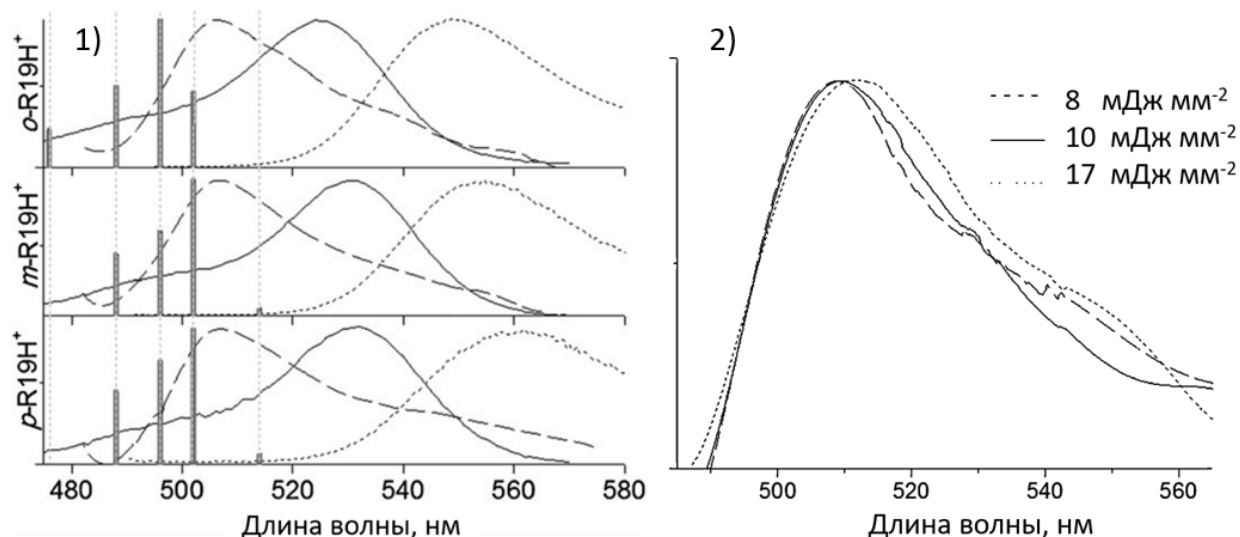


Рис.8. Нормированные оптические спектры изомеров $R19H^+$ в газовой фазе и в растворе. Вертикальные полосы: спектры фотодиссоциативного действия лазера в газовой фазе. Спектры дискретны из-за ограниченного числа линий возбуждения, обеспечиваемых Ar-лазером. Пунктирные линии: флуоресценция, зарегистрированная в облаке ЭРИ ($I_{\text{exc}} = 476$ нм). Сплошные линии: спектры поглощения в метаноле. Пунктирные линии: спектры флуоресценции в метаноле ($I_{\text{exc}} = 476$ нм) (1). Спектры флуоресценции ионов $o\text{-}R19H^+$, захваченных в ячейке ИЦР; получение при различных лазерных воздействиях ($I_{\text{exc}} = 488$ нм) (2)

С использованием разработанного прибора, объединяющего метод ЛИФ и МС ИЦР ПФ с источником ионизации ЭРИ, также подтверждена возможность ФРПЭ в ионах в газовой фазе. Были исследованы две различные пары ФРПЭ на основе карбокси-родинаминовых 6G (доноров) и АТТО590 или Bodipy TR (акцепторных) красителей и изучены их газофазные оптические свойства. Экспериментальные данные указывают на различное поведение двух пар ФРПЭ, что можно объяснить их различными конформациями в газовой фазе. Показано, что при десольватации в источнике ЭРИ одна из пар ФРПЭ претерпевает конформационные изменения, которые приводят к исчезновению резонанса. В газовой фазе cR6G-АТТО590 образовывал при использовании ЭРИ как одно-, так и двухзарядные ионы. В то время как для двухзарядных ионов ФРПЭ явно наблюдался, для однозарядных ионов ФРПЭ отсутствовал, вероятно, из-за образования лактона в фрагменте cR6G. Этот результат говорит о том, что зарядовое состояние ионов необходимо учитывать для правильного расчета хорошей пары ФРПЭ. Были представлены две новые молекулярные

конструкции, которые можно использовать в качестве пар ФРПЭ для прямой корреляции экспериментов в растворах и в газовой фазе (Рис.9).

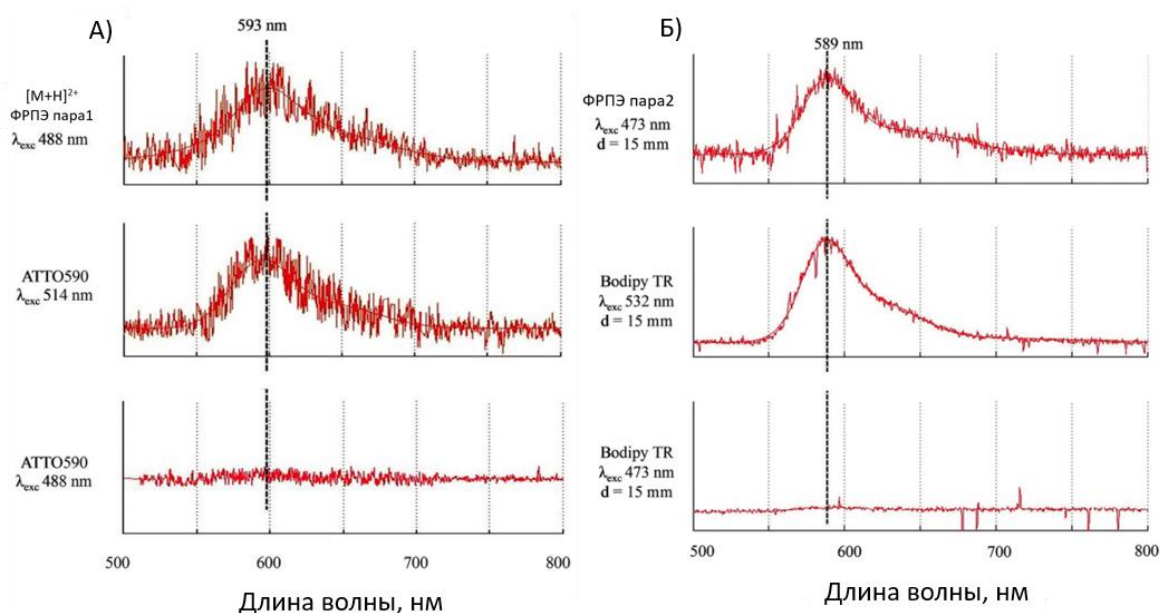


Рис.9. Нормализованный спектр газовой флуоресцентной эмиссии, полученный от ионов $[M+H]^{2+}$ пары ФРПЭ1 (вверху). Максимум излучения наблюдался при 593 нм. В качестве контрольных экспериментов регистрировали спектры флуоресценции ионов АТТО590 с длиной волны лазерного возбуждения 514 нм (в центре) и 488 нм (внизу). При возбуждении при 488 нм флуоресценция не наблюдалась, а при возбуждении при 514 нм наблюдался такой же максимум излучения (А). Нормализованный спектр флуоресцентного излучения пары ФРПЭ2 в условиях окружающей среды на расстоянии 15 мм от наконечника ЭРИ (вверху). Те же измерения были выполнены для ионов Bodipy TR с длинами волн возбуждения 532 нм (в центре) и 473 нм (внизу). Отсутствие флуоресценции от Bodipy TR при длине волны возбуждения 473 нм указывает на появление ФРПЭ в паре 2 (Б)

Изучен вопрос существования биологических молекул в нативной форме в газовой фазе при атмосферном давлении и в вакууме. Описана фундаментальная работа по изучению зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ), а именно его флуоресценции в газовой фазе. Было обнаружено, что флуоресценция ЗФБ полностью отсутствует в вакууме. Это доказывает, что ЗФБ в естественном виде при таких условиях не существует (Рис.10 (1)). Причиной отсутствия флуоресценции ЗФБ может быть потеря белком сольватной оболочки, поддерживающей его структуру, при переходе в вакуум (Рис.10(2)). Показано, что ЭРИ, несмотря на то, что является мягким методом ионизации и способен производить компактные, сложенные ионы биомолекул, не является тем инструментом, который может легко перенести любую биомолекулу в газовую фазу в ее нативном виде. Сделан вывод, что ни точные измерения сечений столкновений, ни распределения зарядовых состояний, ни аналогичные

«глобальные» данные не следует воспринимать как индикаторы существования нативных биомолекул в газовой фазе.

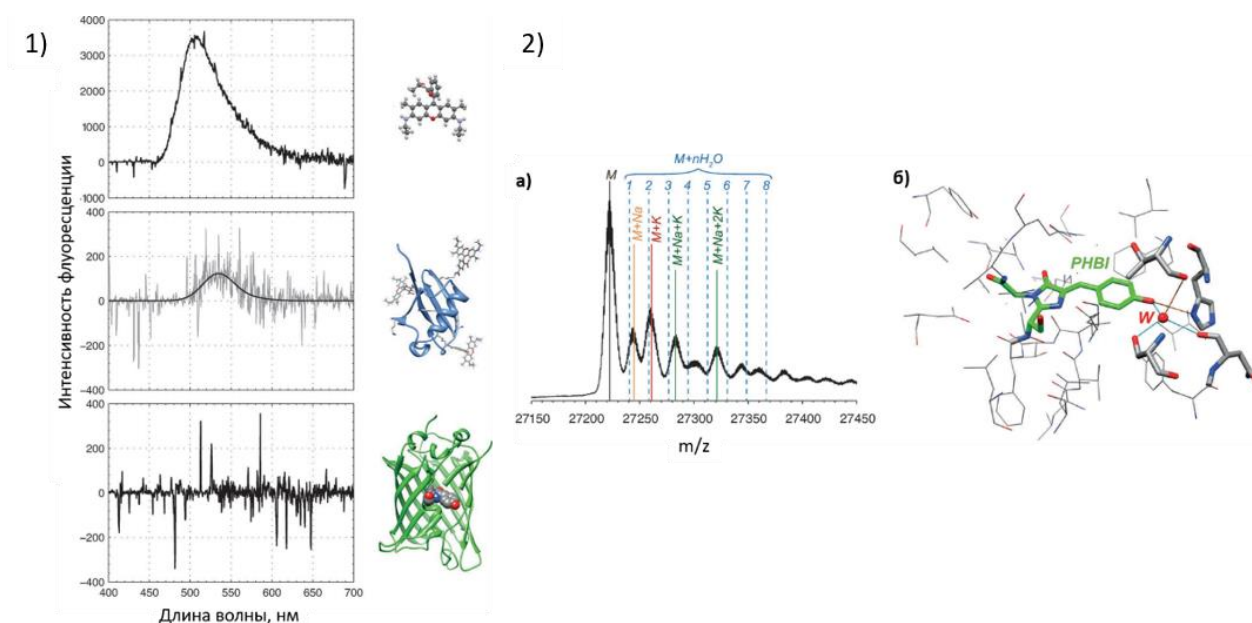


Рис.10. Спектры флуоресценции R6G (вверху), конъюгата убиквитин-карбосиродамин 6G (в центре) и рекомбинантных ионов ЗФБ (внизу), захваченных внутри ячейки ИЦР (1). Масс-спектр высокого разрешения ЗФБ, измеренный в нативных условиях нано-ЭРИ (а). Измеренная масса (27222,6287 Да) хорошо согласуется с рассчитанным значением 27222,535 Да (черная сплошная линия). В спектре не было обнаружено пиков, соответствующих иону ЗФБ, содержащему связанные молекулы воды, такие как W (б), участвующие в сети водородных связей, окружающих хромофор (PHBI на панели б) (2)

Показана возможность образования большого количества газофазных молекул и ионов в источнике ЭРИ при атмосферном давлении. Это было продемонстрировано путем сопоставления спектров флуоресценции, зарегистрированных в облаке ЭРИ, со спектрами изолированных ионов в высоком вакууме масс-спектрометра (Рис.11). Таким образом, изолированные ионы биомолекул могут быть доступны для спектроскопического исследования при атмосферном давлении. Открытие того, что высокие содержания несольватированных ионов могут быть получены внутри облака ЭРИ при атмосферном давлении, существенно расширяет экспериментальный арсенал для исследования их внутренних свойств.

Разработан и создан новый прибор на основе метода ЛИФ и дифференциального анализатора подвижности (ДАП) ионов (Рис.12(1)). В данном исследовании впервые проведена интеграция ДАП с ЛИФ. Поскольку ДАП работает как фильтр подвижности ионов, ионы с известной электрической подвижностью отбираются непрерывно и, как только выходят из ДАП, возбуждаются лазером для получения оптической информации. Кроме того, ионный ток регистрируется с помощью электрометра для получения спектра подвижности (Рис.12(2)). Учитывая, что как структура молекулы, так и ее

флуоресценция являются ключевыми свойствами молекул в газовой фазе, ожидается, что новый гибридный инструмент будет иметь большой потенциал для решения многих фундаментальных и прикладных задач.

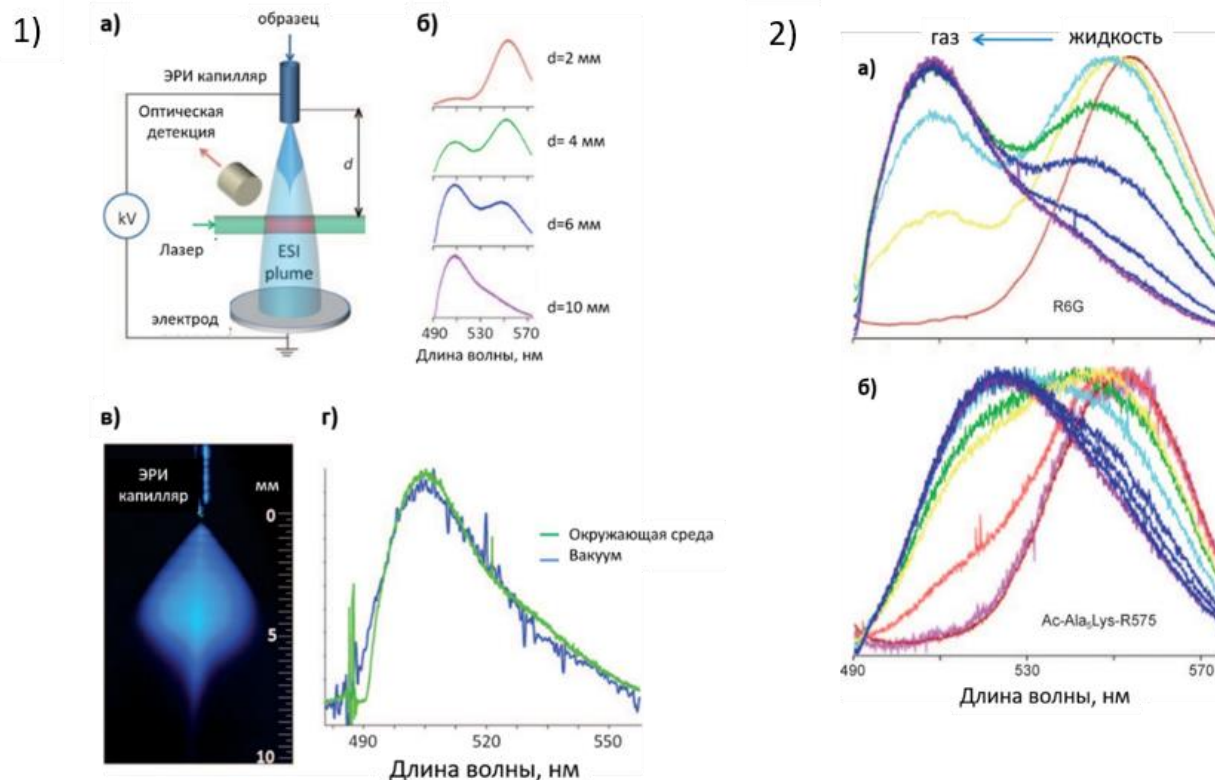


Рис.11. Экспериментальная установка для оптической спектроскопии в облаке ЭРИ (а). Спектры флуоресценции, полученные из разных областей в облаке ЭРИ при электрораспылении раствора R6G в метаноле (б). Фотография верхней части облака ЭРИ (синий цвет обусловлен рассеянием лазерного света от капель в струе) (в). Спектры флуоресценции ионов R6G, записанные с помощью спектроскопии ЛИФ на спектрометре ИЦР ПФ (синий) и в облаке ЭРИ (зеленый) (г) (1). Эволюция спектра флуоресценции при движении вниз (от красного к фиолетовому) вдоль облака ЭРИ для R6G (а) и пептида Ac-Ala₅-Lys-R575 (б) (2)

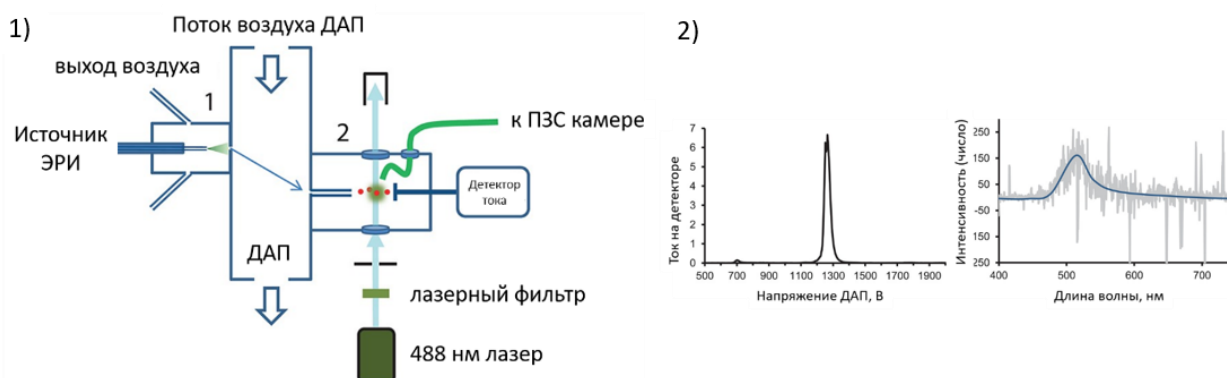


Рис.12. Схема установки ДАП-ЛИФ (1). Необработанный спектр ДАП R6G (слева). Спектр ЛИФ при напряжении DMA 1250 В, время накопления 600 с; фон вычтен (справа) (2)

Позднее были сделаны изменения в конструкции детектора ДАП, которые позволили использовать предложенный гибридный прибор как для исследований сложных смесей биомолекул в газовой фазе, так и для малых молекул и их производных с высокой чувствительностью. Впервые была зарегистрирована флуоресценция зеленого флуоресцентного белка в газовой фазе и продемонстрировано сохранение структуры, присущей этому белку в растворе, при его переносе в газовую фазу.

Открытие возможности исследования газозависимых ионов с помощью метода ЛИФ при атмосферном давлении позволило заново провести исследования механизмов ионизации при атмосферном давлении и дополнить уже имеющиеся теории образования ионов новыми уникальными данными. Был доказан механизм ионизации ЭРИ методом «высыхания капли» для малых и средних молекул. Исследованы методы десорбционной электрораспылительной ионизации (ДЭРИ), лазерно-активированной ионизации (ЛАИ) и МАЛДИ при атмосферном давлении. Показано, что во всех этих методах образец десорбируется с поверхности подложки в сольватированной или кластерной форме. Это могут быть кластеры матрицы-R6G в случае экспериментов МАЛДИ или ЛЭИ и кластеры с растворителем ЭРИ в случае ДЭРИ (Рис.13).

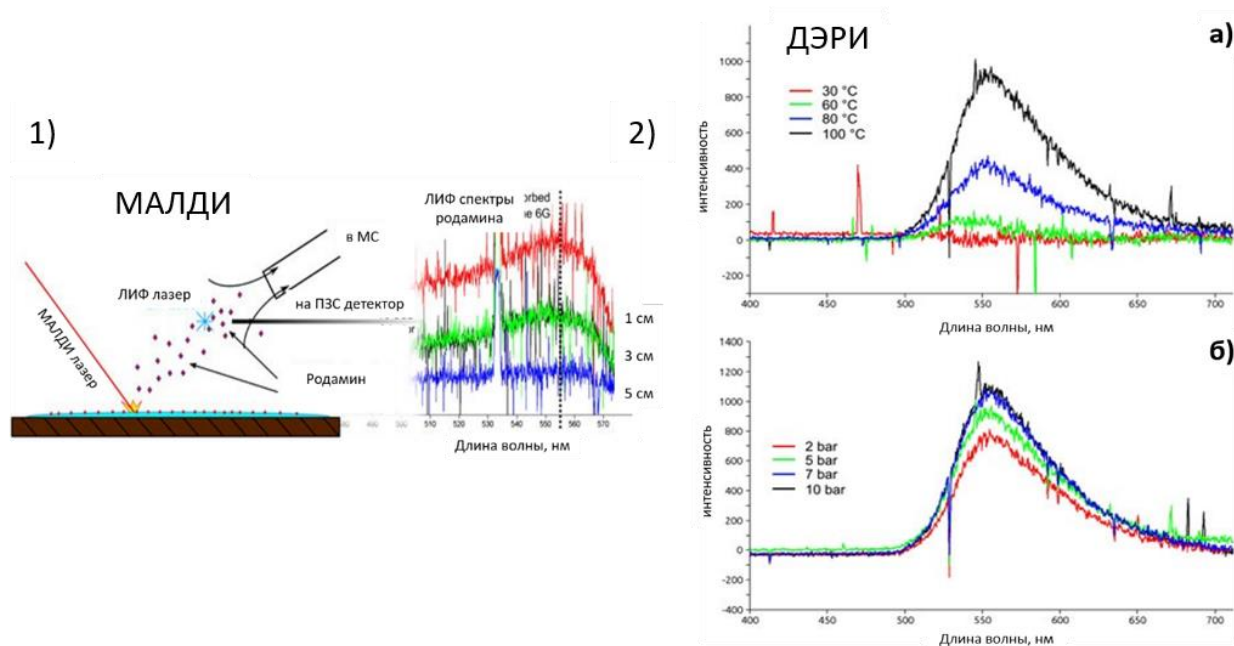


Рис.13. Эксперимент МАЛДИ при атмосферном давлении и полученные спектры ЛИФ. Образец десорбируется в сольватированной форме или в форме кластеров (1); спектры ЛИФ облака ДЭРИ: (а) зависимость от температуры и (б) зависимость от давления газа в распылителе. ЛИФ спектр показывает образование кластеров родамина (2)

Глава 5. Заключительный раздел диссертации посвящен исследованиям в области клинической масс-спектрометрии, в которой нашли отражение многие из разработанных методик, и показано практическое применение прямых

методов ионизации при атмосферном давлении (Рис.14(1)). При разработке источников ионов для этих методов частично использовались результаты, описанные в предыдущих главах. Были оценены перспективы применения метода прямой масс-спектрометрии для сравнительного анализа молекулярного состава тканей эктопического и эутопического эндометрия. Впервые проведено детальное исследование эндометриозных поражений различной локализации методами прямой масс-спектрометрии (Рис.14 (2)). Использование уникального источника ЭРИ с ткани, который позволил проводить исследования эндометриозных тканей без какой-либо предварительной подготовки образцов, позволило определить набор липидов, характерных для данной ткани определенного типа. Показано, что методы прямой МС могут быть использованы для диагностических целей и разработки новых стратегий лечения. Было проведено детальное сравнение метода ЭРИ с ткани с классическими методами, включающими экстракцию липидов, ЭРИ и хроматографию.

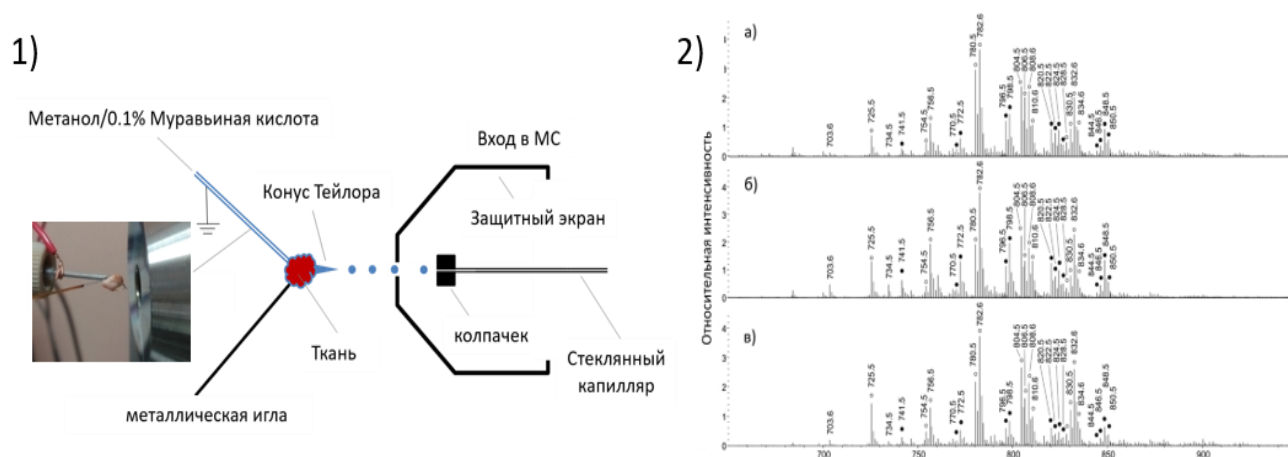


Рис.14. Схема источника ЭРИ с ткани (1). Масс-спектры ЭРИ с ткани (а) эутопического эндометрия; (б) эндометриотическая киста яичника; (в) тазовый эндометриоз (2)

Показано, что ЭРИ с тканей позволяет дифференцировать ткани эндометрия с несколько меньшей специфичностью, чем классический метод ЭРИ МС. Но основное преимущество ЭРИ с тканей заключается в том, что данный метод в несколько раз быстрее (несколько минут на образец), чем классический подход, основанный на экстракции (десятки минут на образец). ЭРИ с ткани и ЭРИ экстракта липидов дают похожие спектры с существенным различием в типе аддуктов. На основании проведенных исследований тканей была показана возможность МС обнаружения биомаркеров эндометриоза как в тканях, так и в физиологических жидкостях, таких как плазма крови и перитонеальная жидкость. Метаболиты, ранее идентифицированные в эктопическом эндометрии, были оценены в крови и брюшной жидкости женщин с эндометриозом (Рис.15).

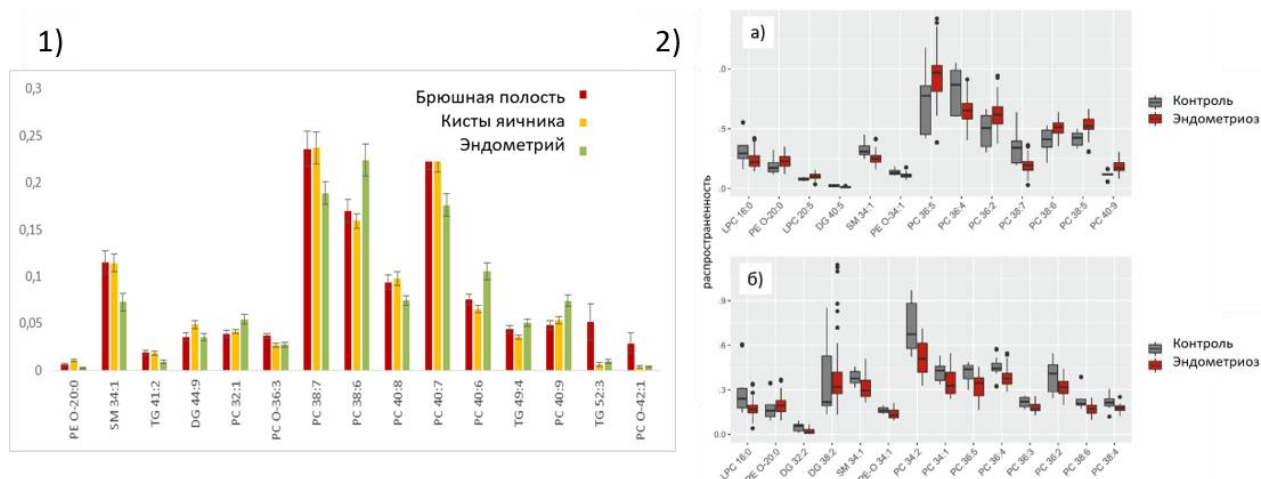


Рис.15. Сравнение веществ трех типов тканей (красный — эндометриоз на брюшной полости таза, желтый — эндометриоидные кисты яичника, зеленый — эндометрий), которые вносят основной вклад в отличие этих тканей (1). Сравнение уровней липидов с наибольшим влиянием на разделение между эндометриозом и контрольной группой в плазме крови (а) и в перитонеальной жидкости (б) (2)

Было обнаружено, что уровни некоторых сфинго- и фосфолипидов различаются в биологических жидкостях пациентов с эндометриозом и без. Полученные данные показали, что анализ профиля липидов плазмы позволяет выявлять пациентов с эндометриозом с более высокой чувствительностью, чем анализ перитонеальной жидкости. Дальнейшая валидация выявленных липидов как серологических биомаркеров может улучшить неинвазивные диагностические инструменты для пациентов с подозрением на эндометриоз и снизить потребность в инвазивной процедуре диагностической лапароскопии.

Показана эффективность использования метода ЭРИ с ткани для идентификации опухолевых тканей. Доказаны возможности прямой масс-спектрометрии в быстрой и точной идентификации злокачественных тканей. Показано, что помимо дифференцировки тканей, использование метода ЭРИ с ткани позволяет обнаруживать липидные паттерны, характерные для рака молочной железы, которые могут быть предложены в качестве диагностических биомаркеров.

Создана уникальная система «умный нож» на основе методов прямой масс-спектрометрии (Рис. 16 (1)), которая может быть использована для диагностики и во время хирургического лечения онкологических заболеваний. На примере молекулярной дифференцировки раковых тканей молочной железы показана эффективность установки на основе экстракционной электрораспылительной ионизации (ЭЭРИ МС), комбинированной с низкотемпературным электрокоагулятором. Данная система обеспечила быструю и надежную дифференциацию раковых тканей молочной железы и нормальной ткани с чувствительностью 97%, специфичностью 94% и пространственной точностью не менее 1 мм (Рис.16(2,3)).

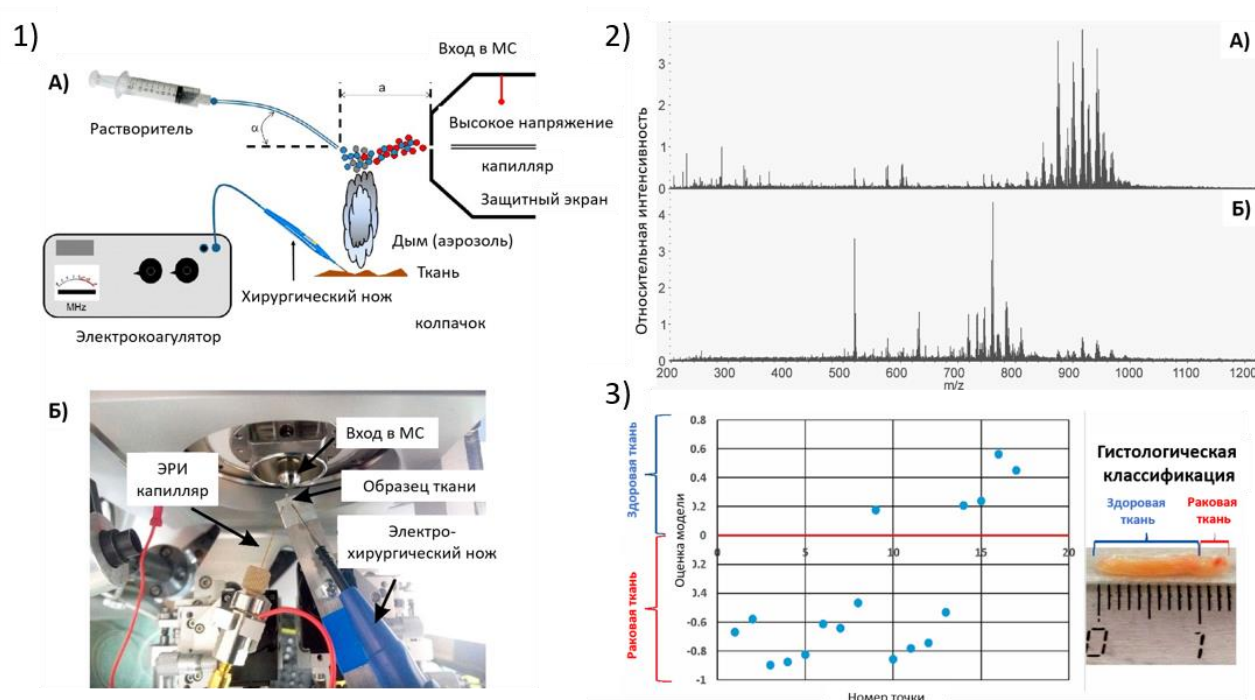


Рис. 16. Схема экспериментальной установки по молекулярной визуализации тканей(1). Масс-спектры положительных ионов нормальной (здоровой) ткани (А) и раковой ткани (Б), выполненные с использованием ЭЭРИ аэрозолей, полученных низкотемпературным электрокоагулятором (2); классификация ткани в зависимости от ее пространственного положения. Оценки были получены путем анализа масс-спектров ЭЭРИ МС с низкотемпературным электрокоагулятором с помощью разработанной модели OPLS-DA (3)

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. Впервые обнаружены свободные электроны и экспериментально доказана их роль в процессах МАЛДИ. Открытие свободных электронов, генерируемых в методе МАЛДИ, позволило выдвинуть экспериментально обоснованные гипотезы, объясняющие ряд существенных явлений, характерных для этого метода, например, образование отрицательных ионов путем захвата электронов, образование преимущественно однозарядных ионов. Предложена простая модель взаимодействия электронов с молекулами и ионами матрицы и образца, присутствующими в облаке МАЛДИ. Исследовано влияние кинетической энергии электронов и давления буферного газа на процессы образования ионов в методе МАЛДИ. Показано, что только электроны с определенной кинетической энергией в первую очередь ответственны за уменьшение сигнала положительных ионов.

2. Проведены уникальные эксперименты по измерению начальных скоростей ионов в МАЛДИ. Этими экспериментами были подтверждены или опровергнуты некоторые теории образования ионов в методе МАЛДИ. Доказано, что ионы

образуются через несколько микросекунд после выстрела лазера, в начальный же момент в облаке присутствуют тяжелые заряженные кластеры. Предложен оригинальный метод измерения температуры в облаке МАЛДИ. Были выполнены временные измерения температуры поверхности для различных матриц МАЛДИ. Продемонстрировано, что испарительное охлаждение работает для всех исследованных матриц во время лазерного импульса и в значительной степени контролирует достигнутые пиковые температуры. Полученные данные показывают, что термоионизация не играет главной роли в процессе образования ионов в методе МАЛДИ.

3. Создан новый тип масс-спектрометра, который позволяет проводить широкополосное неразрушающее детектирование ионов в квадрупольной ионной ловушке. Впервые показана возможность широкополосного неразрушающего детектирования ионов с использованием преобразования Фурье в масс-спектрометре с ионной ловушкой.

4. Разработаны новые конструкции ячеек масс-спектрометра ИЦР ПФ, основанные на открытой конфигурации электродов, для улучшения характеристик МС ИЦР ПФ при работе с внутренним источником МАЛДИ. Внедрение данных конструкций в МС ИЦР ПФ позволило объединить преимущества внутренних и внешних источников МАЛДИ в общем приборе.

5. Впервые получены оптические спектры лазерно-индуцированной флуоресценции ионов биомолекул в газовой фазе, в МС ИЦР ПФ. На примере ионов родамина показана важность изучения оптических свойств молекул в газовой фазе.

6. Впервые показан флуоресцентный резонансный перенос энергии в молекулах в газовой фазе. ФРПЭ является чувствительным к внутримолекулярным расстояниям методом, в котором изменения интенсивности флуоресценции коррелируют с изменениями расстояния и ориентации конкретных спектроскопически активных (донорных, акцепторных) фрагментов. Были представлены две новые молекулярные конструкции, которые можно использовать в качестве пар ФРПЭ для сравнительного экспериментального исследования свойств молекул в растворах и в газовой фазе.

7. Экспериментально доказано высокое содержание десольватированных ионов внутри облака ЭРИ при атмосферном давлении, что существенно расширяет экспериментальный арсенал для исследования их внутренних свойств. Открытие возможности изучения газофазных ионов при атмосферном давлении с помощью метода ЛИФ позволило заново провести исследования механизмов ионизации при атмосферном давлении и значительно дополнить уже имеющиеся теории образования ионов новыми уникальными данными.

8. Изучен вопрос конформационного состояния биологических молекул в газовой фазе при атмосферном давлении и в вакууме. Выполнена фундаментальная работа по изучению флуоресценции зеленого флуоресцентного белка в газовой фазе. Показано, что мягкие методы ионизации не является теми инструментами, с помощью которых можно перенести любую биомолекулу в газовую фазу в ее нативной форме.

9. Разработан и создан новый прибор на основе метода ЛИФ и дифференциального анализатора подвижности ионов. Учитывая, что как структура молекулы, так и ее флуоресценция являются ключевыми свойствами молекул в газовой фазе, ожидается, что новый гибридный инструмент будет иметь потенциал для решения многих фундаментальных и прикладных задач в области молекулярной и химической физики.

10. Показано, что методы прямой МС могут быть использованы для диагностических целей и разработки новых стратегий лечения. Показана эффективность использования метода ЭРИ с ткани для идентификации раковых тканей. Использование уникального источника ЭРИ с ткани позволило проводить исследования эндометриодных тканей без какой-либо предварительной подготовки образцов и определить набор липидов, характерных для данного заболевания.

11. На основе методов прямой масс-спектрометрии создана уникальная система «умный нож», которая может быть использована для диагностики и во время хирургического лечения онкологических заболеваний. На примере молекулярной дифференцировки раковых тканей молочной железы показана эффективность установки на основе ЭЭРИ МС, комбинированной с низкотемпературным электрокоагулятором. Данная система обеспечила быструю и надежную дифференциацию раковых тканей молочной железы и нормальной ткани с чувствительностью 97%, специфичностью 94% и пространственной точностью не менее 1 мм.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Тоноян Н.М. Прогнозирование рецидива миомы матки на основании масс-спектрометрического анализа тканей миометрия и миоматозных узлов / Тоноян Н.М., Токарева А.О., Чаговец В.В., Козаченко И.Ф., Стародубцева Н.Л., Адамян Д.В., Франкевич В.Е. // Проблемы репродукции – 2020. – Т. 26 – № 2 – С.69–78.

2. Sukhikh G. Combination of low-temperature electrosurgical unit and extractive electrospray ionization mass spectrometry for molecular profiling and classification of tissues / Sukhikh G., Chagovets V., Wang X., Rodionov V., Kometova V., Tokareva A., Kononikhin A., Starodubtseva N., Chingin K., Chen H., Chen H., Frankevich V. // Molecules – 2019. – Т. 24 – № 16.

3. Starodubtseva N. Identification of potential endometriosis biomarkers in peritoneal fluid and blood plasma via shotgun lipidomics / Starodubtseva N., Chagovets V., Borisova A., Salimova D., Aleksandrova N., Chingin K., Chen H., Frankevich V. // Clinical Mass Spectrometry – 2019. – Т. 13 – С.21–26.

4. Chagovets V. Relative quantitation of phosphatidylcholines with interfered masses of protonated and sodiated molecules by tandem and Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Chagovets V., Kononikhin A., Tokareva A., Bormotov D., Starodubtseva N., Kostyukevich Y., Popov I., Frankevich V., Nikolaev E. // European Journal of Mass Spectrometry – 2019. – Т. 25 – № 2 – С.259–264.

5. Тоноян Н.М. Возможности диагностики миомы матки и ее рецидива по липидному анализу плазмы крови / Тоноян Н.М., Токарева А.О., Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л., Козаченко И.Ф., Адамян Л.В., Франкевич В.Е. // *Акушерство и гинекология* – 2019. – Т. 2019 – № 11 – С.136–151.
6. Тоноян Н.М. Рецидивы миомы матки. Современный взгляд на проблемы диагностики, лечения и прогнозирования / Тоноян Н.М., Козаченко И.Ф., Франкевич В.Е., Чаговец В.В., Адамян Л.В. // *Акушерство и гинекология* – 2019. – № 3 – С.32–38.
7. Chagovets V. A Comparison of Tissue Spray and Lipid Extract Direct Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Differentiation of Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues / Chagovets V., Wang Z., Kononikhin A., Starodubtseva N., Borisova A., Salimova D., Popov I., Kozachenko A., Chingin K., Chen H., Adamyan L., Sukhikh G., Frankevich V., Adamyan L., Sukhikh G. // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* – 2018. – Т. 29 – № 2 – С.323–330.
8. Adamyan L.V. Direct Mass Spectrometry Differentiation of Ectopic and Eutopic Endometrium in Patients with Endometriosis / Adamyan L.V., Starodubtseva N., Borisova A., Stepanian A.A., Chagovets V., Salimova D., Wang Z., Kononikhin A., Popov I., Bugrova A., Chen H., Frankevich V., Chingin K., Kozachenko A., Chen H., Frankevich V., Chingin K., Kozachenko A., Chen H., Frankevich V. // *Journal of Minimally Invasive Gynecology* – 2018. – Т. 25 – № 3 – С.426–433.
9. Токарева А.О. Прямая масс-спектрометрия как метод экспресс-идентификации опухолевой ткани у больных раком молочной железы / Токарева А.О., Чаговец В.В., Чжихао Ван, Родионов В.В., Кометова В.В., Родионова М.В., Кононихин А.С., Стародубцева Н.Л., Чингин К., Франкевич В.Е., Хуаньвэнь Чэнь, Сухих Г.Т. // *Акушерство и гинекология* – 2017. – № 4 – С.119–125.
10. Борисова А.В. Сравнительный анализ липидного состава перитонеальной жидкости и плазмы крови у пациенток с наружным генитальным эндометриозом и миомой матки / Борисова А.В., Чаговец В.В., Козаченко А.В., Стародубцева Н.Л., Кононихин А.С., Салимова Д.Ф., Коган Е.А., Адамян Л.В., Франкевич В.Е., Сухих Г.Т. // *Акушерство и гинекология* – 2017. – № 6 – С.74–82.
11. Борисова А.В. Исследование очагов эндометриоза различной локализации методом прямой масс-спектрометрии / Борисова А.В., Стародубцева Н.Л., Козаченко А.В., Чаговец В.В., Салимова Д.Ф., Кононихин А.С., Коган Е.А., Адамян Л.В., Франкевич В.Е., Сухих Г.Т. // *Акушерство и гинекология* – 2016. – № 9 – С.101–108.
12. Chagovets V.V. Endometriosis foci differentiation by rapid lipid profiling using tissue spray ionization and high resolution mass spectrometry / Chagovets V.V., Wang Z., Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Borisova A., Salimova D., Popov I.A., Kozachenko A.V., Chingin K., Chen H., Adamyan L.V., Sukhikh G.T., Frankevich V.E., Adamyan L.V., Sukhikh G.T. // *Scientific Reports* – 2017. – Т. 7 – № 1.

13. Chagovets V. Peculiarities of data interpretation upon direct tissue analysis by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Chagovets V., Kononikhin A., Starodubtseva N., Kostyukevich Y., Popov I., Frankevich V., Nikolaev E. // *European Journal of Mass Spectrometry* – 2016. – T. 22 – № 3 – C.123–126.
14. Tomalová I. On initial ion velocities in MALDI: A novel FT-ICR MS approach / Tomalová I., Frankevich V., Zenobi R. // *International Journal of Mass Spectrometry* – 2014. – T. 372 – C.51–53.
15. Chagovets V. Initial velocity distribution of MALDI/LDI ions measured by internal MALDI source fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Chagovets V., Frankevich V., Zenobi R. // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* – 2014. – T. 25 – № 11 – C.1991–1994.
16. Frankevich V. Native biomolecules in the gas phase? the case of green fluorescent protein / Frankevich V., Barylyuk K., Chingin K., Nieckarz R., Zenobi R. // *ChemPhysChem* – 2013. – T. 14 – № 5 – C.929–935.
17. Frankevich V. Ion mobility spectrometry coupled to laser-induced fluorescence / Frankevich V., Martinez-Lozano Sinues P., Barylyuk K., Zenobi R. // *Analytical Chemistry* – 2013. – T. 85 – № 1 – C.39–43.
18. Frankevich V.E. Ion mobility spectrometry coupled to laser-induced fluorescence for probing the electronic structure and conformation of gas-phase ions / Frankevich V.E., Barylyuk K.V., Martinez-Lozano Sinues P., Zenobi R. // *Journal of Analytical Chemistry* – 2014. – T. 69 – № 13 – C.1215–1219.
19. Frankevich V. Probing the mechanisms of ambient ionization by laser-induced fluorescence spectroscopy / Frankevich V., Nieckarz R.J.J., Sagulenko P.N.N., Barylyuk K., Zenobi R., Levitsky L.I.I., Agapov A.Y.Y., Perlova T.Y.Y., Gorshkov M.V. V., Tarasova I.A.A. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry* – 2012. – T. 26 – № 13 – C.1567–1572.
20. Wang R. The role of nebulizer gas flow in electrosonic spray ionization (ESSI) / Wang R., Allmendinger P., Zhu L., Gröhn A.J.A.J., Wegner K., Frankevich V., Zenobi R. // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* – 2011. – T. 22 – № 7 – C.1234–1241.
21. Chingin K. Absorption of the green fluorescent protein chromophore anion in the gas phase studied by a combination of FTICR mass spectrometry with laser-induced photodissociation spectroscopy / Chingin K., Balabin R.M., Frankevich V., Barylyuk K., Nieckarz R., Sagulenko P., Zenobi R. // *International Journal of Mass Spectrometry* – 2011. – T. 306 – № 2–3 – C.241–245.
22. Chingin K. Direct Access to Isolated Biomolecules under Ambient Conditions / Chingin K., Frankevich V., Balabin R.M., Barylyuk K., Chen H., Wang R., Zenobi R. // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2010. – T. 49 – № 13 – C.2358–2361.
23. Chingin K. Optical properties of protonated Rhodamine 19 isomers in solution and in the gas phase / Chingin K., Balabin R.M., Frankevich V., Chen H., Barylyuk K.,

- Nieckarz R., Fedorov A., Zenobi R. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2010. – Т. 12 – № 42 – С.14121–14127.
24. Chingin K. Rhodamines in the gas phase: Cations, neutrals, anions, and adducts with metal cations / Chingin K., Balabin R.M., Barylyuk K., Chen H., Frankevich V., Zenobi R. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2010. – Т. 12 – № 37 – С.11710–11714.
25. Dashtiev M. Kinetic energy of free electrons affects MALDI positive ion yield via capture cross-section / Dashtiev M., Frankevich V., Zenobi R. // *Journal of Physical Chemistry A* – 2006. – Т. 110 – № 3 – С.926–930.
26. Франкевич В.Е. Высокоэффективный анализ и идентификация пептидов и белков с использованием масс-спектрометрии с квадрупольной ловушкой / Франкевич В.Е., Зиганшин Р. Х., Поляков Н. Б., Гринкевич В. А., Арсеньев А. С. // *Масс-спектрометрия* – 2006. – Т. 3 - № 3 – С.161–167.
27. Kononikhin A.S. Letter: Multiply charged ions in matrix-assisted laser desorption/ionization generated from electrosprayed sample layers / Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Frankevich V., Zenobi R. // *European Journal of Mass Spectrometry* – 2005. – Т. 11 – № 3 – С.257–259.
28. Frankevich V. Laser-induced fluorescence of trapped gas-phase molecular ions generated by internal-source matrix-assisted laser desorption/ionization in a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer / Frankevich V., Guan X., Dashtiev M., Zenobi R. // *European Journal of Mass Spectrometry* – 2005. – Т. 11 – № 5 – С.475–482.
29. Dashtiev M. Signal enhancement in matrix-assisted laser desorption/ionization by doping with Cu(II) chloride [2] / Dashtiev M., Frankevich V., Zenobi R. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry* – 2005. – Т. 19 – № 2 – С.289–291.
30. Dashtiev M. Clear evidence of fluorescence resonance energy transfer in gas-phase ions / Dashtiev M., Azov V., Frankevich V., Scharfenberg L., Zenobi R. // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* – 2005. – Т. 16 – № 9 – С.1481–1487.
31. Frankevich V.E. Clusters as deconvolutions of ions in UV-matrix-activated laser desorption/ionization / Frankevich V.E., Dashtiev M., Zenobi R. // *Khimicheskaya Fizika* – 2004. – Т. 23 – № 11 – С.44–51.
32. Koubenakis A. Time-Resolved Surface Temperature Measurement of MALDI Matrices under Pulsed UV Laser Irradiation / Koubenakis A., Frankevich V., Zhang J., Zenobi R. // *Journal of Physical Chemistry A* – 2004. – Т. 108 – № 13 – С.2405–2410.
33. Frankevich V. Production and fragmentation of multiply charged ions in “electron-free” matrix-assisted laser desorption/ionization / Frankevich V., Zhang J., Dashtiev M., Zenobi R. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry* – 2003. – Т. 17 – № 20 – С.2343–2348.
34. Zhang J. Reduction of Cu(II) in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / Zhang J., Frankevich V., Knochenmuss R., Friess S.D., Zenobi R. //

- Journal of the American Society for Mass Spectrometry – 2003. – T. 14 – № 1 – C.42–50.
35. Frankevich V.E. Role of Electrons in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry / Frankevich V.E., Zhang J., Friess S.D., Dashtiev M., Zenobi R. // Analytical Chemistry – 2003. – T. 75 – № 22 – C.6063–6067.
36. Gorshkov M.V. Letter: Characteristics of photoelectrons emitted in matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance experiments / Gorshkov M.V., Frankevich V.E., Zenobi R. // European Journal of Mass Spectrometry – 2002. – T. 8 – № 1 – C.67–69.
37. Frankevich V. The origin of electrons in MALDI and their use for sympathetic cooling of negative ions in FTICR / Frankevich V., Knochenmuss R., Zenobi R. // International Journal of Mass Spectrometry – 2002. – T. 220 – № 1 – C.11–19.
38. Frankevich V.E. Improvement in the resolving power of spectrometer of ionic cyclotron resonance due to cooling the negatively charged ions with free electrons / Frankevich V.E., Zenobi R. // Khimicheskaya Fizika – 2002. – T. 21 – № 4 – C.28–32.
39. Frankevich V. Flexible open-cell design for internal-source matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Frankevich V., Zenobi R. // Rapid Communications in Mass Spectrometry – 2001. – T. 15 – № 12 – C.979–985.
40. Frankevich V. Dynamic ion trapping in a cylindrical open cell for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Frankevich V., Zenobi R. // International Journal of Mass Spectrometry – 2001. – T. 207 – № 1–2 – C.57–67.
41. Frankevich V. Deceleration of high-energy matrix-assisted laser desorption/ionization ions in an open cell for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Frankevich V., Zenobi R. // Rapid Communications in Mass Spectrometry – 2001. – T. 15 – № 21 – C.2035–2040.
42. Франкевич В.Е. Новые возможности спектрометра ионного циклотроного резонанса с открытой ячейкой удержания ионов / Франкевич В.Е., Зеноби Р. // Химическая физика – 2001. – Т. 20 – № 7 – С.33–47.
43. Nappi M. Characteristics of a broad-band Fourier transform ion trap mass spectrometer / Nappi M., Frankevich V., Soni M., Cooks R.G. // International Journal of Mass Spectrometry – 1998. – T. 177 – № 1 – C.91–104.
44. Soni M. Broad-band fourier transform quadrupole ion trap mass spectrometry / Soni M., Frankevich V., Nappi M., Santini R.E., Amy J.W., Cooks R.G. // Analytical Chemistry – 1996. – T. 68 – № 19 – C.3314–3320.