

# Przygotowanie wielopierwiastkowych wzorców stałych na bazie żelatyny do badania rozmieszczenia pierwiastków w próbkach klinicznych metodą LA-ICP-MS



**KORNELIA JANKOWSKA**

Opiekun pracy: *mgr Agata Jagielska*

Promotor pracy: *dr hab. Barbara Wagner*

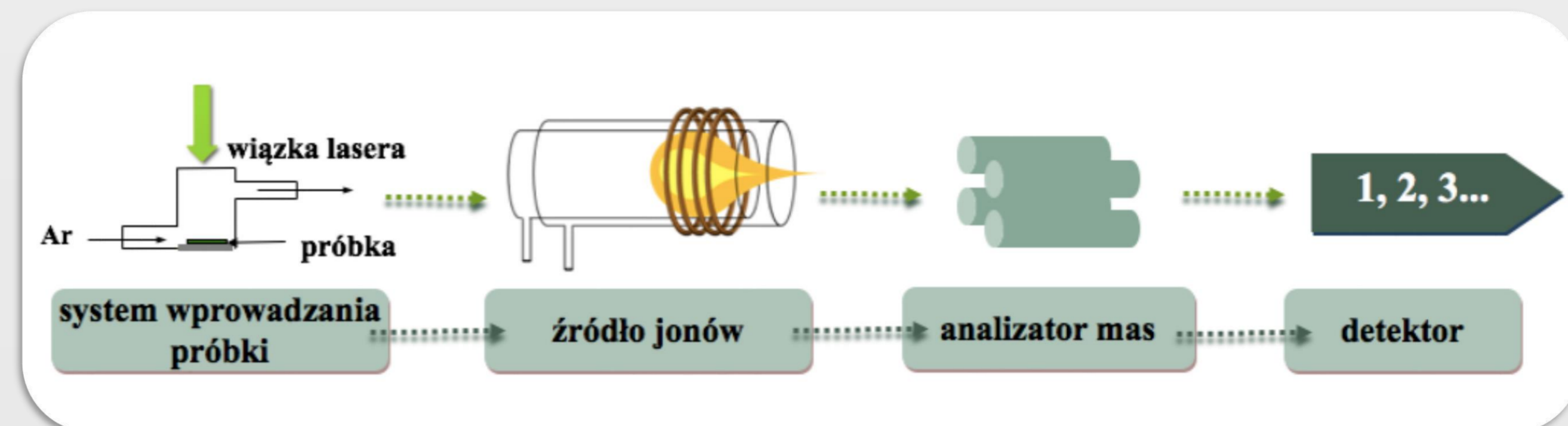


Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej

## LA-ICP-MS

ablacja laserowa połączona ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej

Metoda ta łączy ablację laserową (ang. *laser ablation* – LA) będącą systemem wprowadzania próbki oraz spektrometrię mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry* – ICP-MS). Połączenie to spełnia zadanie wytwarzania jonów oraz pełni rolę analizatora mas i detektora badanych pierwiastków.



## Strategie kalibracji w badaniach tkanek

Dopasowanie wzorców, które będą reprezentowały próbkę nie tylko pod kątem zawartości pierwiastków, ale i pod względem jej struktury i charakteru bywa trudne, zwłaszcza w analizie próbek biologicznych. Szczególnie w przygotowywaniu wzorców stałych wymagany jest wysoki poziom homogeniczności i równomiernego rozmieszczenia analitu.

### Homogenizacja tkanki

- proces wytwarzania wieloskładnikowej mieszaniny jednorodnej
- prowadzona przy użyciu narzędzi manualnych

### Sucha kropla

- wybierana w analizie próbek ciekłych
- badana próbka przenoszona jest na powierzchnię membrany filtracyjnej i pozostawiana do wyschnięcia

### Filmy z polimerów

- pozwalają osiągać wysoki stopień dopasowania do matrycy
- przygotowywane z polimerów biologicznych, np. agarozy i żelatyny

### Sprasowane tabletki

- wybierane w przypadku dysponowania małą ilością próbek
- z materiałów odniesienia wytwarzana jest na prasie hydraulicznej niewielka pastylka

## Cel pracy

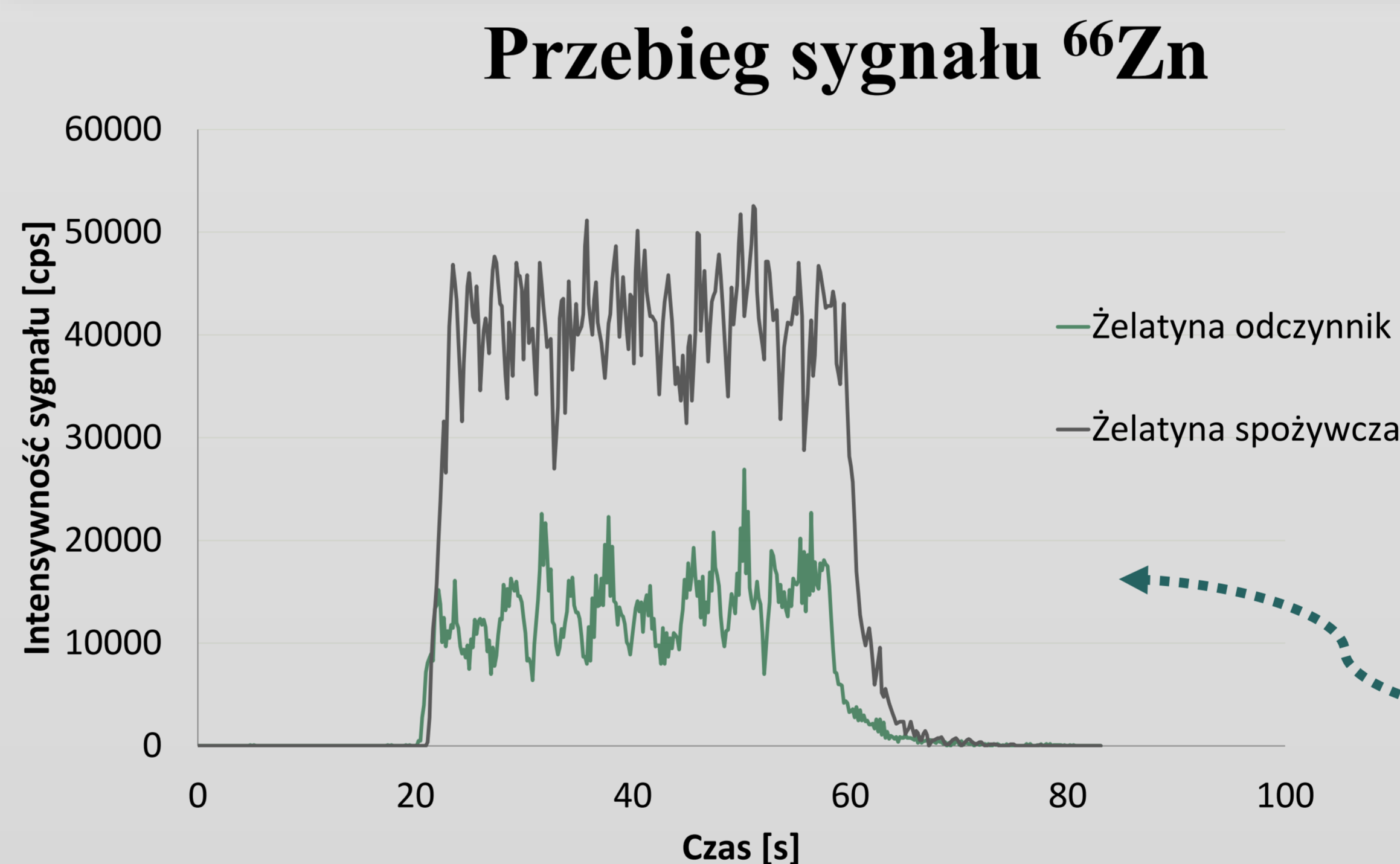
- zobrazowanie rozmieszczenia pierwiastków w próbkach klinicznych metodą LA-ICP-MS z możliwością przeprowadzenia lokalnych oznaczeń ilościowych,
- opracowanie ścieżki kalibracyjnej umożliwiającej wykonanie oznaczeń ilościowych przy użyciu wzorców żelatynowych,
- ocena wpływu suplementacji w diecie cynkiem i miedzią na zawartość tych pierwiastków w próbkach pobranych od zwierząt.

## Podział badanych próbek raka gruczołu sutkowego

| Grupa | Tkanka           | Dieta                                |
|-------|------------------|--------------------------------------|
| 1     | nowotworowa      | standardowa                          |
| 2     | nowotworowa      | suplementacja cynkiem                |
| 3     | nowotworowa      | suplementacja cynkiem i resweratolem |
| 4     | nowotworowa      | suplementacja miedzią                |
| 5     | nowotworowa      | suplementacja miedzią i resweratolem |
| 6     | okołonowotworowa | standardowa                          |

| Warunki pracy układu                                      | Wzorce żelatynowe                        | Próbki guzów |
|---|--|--------------|
| Model spektrometru  | NeXION 300D (Perkin Elmer)               |              |
| Układ wprowadzania próbki                                 | system ablacji laserowej LSX-213 (CETAC) |              |
| Liczba linii ablacji                                      | 1  | 19           |
| Energia lasera [mJ]                                       | 5  |              |
| Częstotliwość impulsów lasera [Hz]                        | 20                                       |              |
| Średnica wiązki lasera [μm]                               | 100/150                                  | 100          |
| Szybkość przesuwania próbki względem wiązki lasera [μm/s] | 50/100                                   | 100          |
| Moc plazmy [W]  | 1350                                     |              |
| Prędkość przepływu gazu nośnego (Ar) [l/min]              | 0,8-0,9                                  |              |
| Czas odczytu dla pojedynczego izotopu [ms]                | 5  |              |
| Czas rejestracji tła przed rozpoczęciem ablacji [s]       | 20                                       |              |

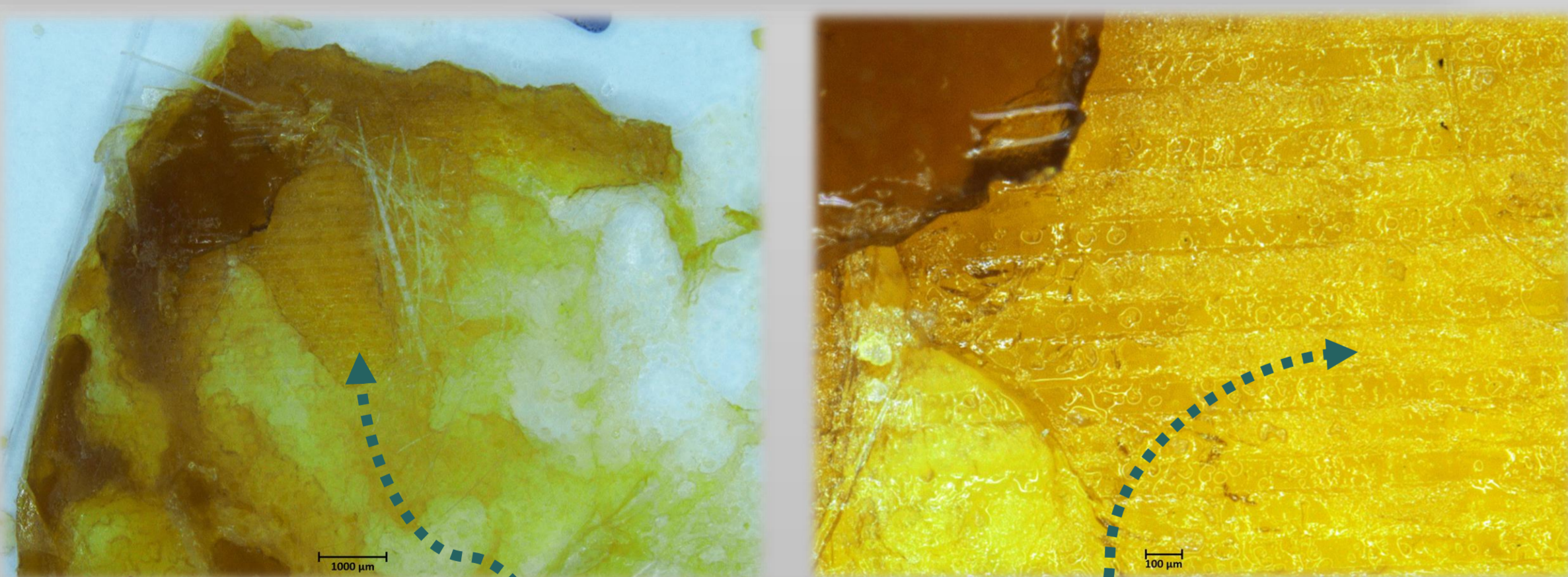
## Porównanie rodzajów żelatyn w przygotowywaniu wzorców stałych



| Pierwiastek                        | <sup>66</sup> Zn |           |
|------------------------------------|------------------|-----------|
| Żelatyna                           | spożywcza        | odczynnik |
| Średnia intensywność sygnału [cps] | 41277            | 13495     |
| SD                                 | 4687             | 3427      |
| RSD [%]                            | 11               | 25        |

Żelatyna spożywcza wyróżniła się większą stabilnością sygnału. To zdecydowało o jej wyborze do przygotowywania wzorców.

## Zdjęcia mikroskopowe guzów po mikropróbkowaniu

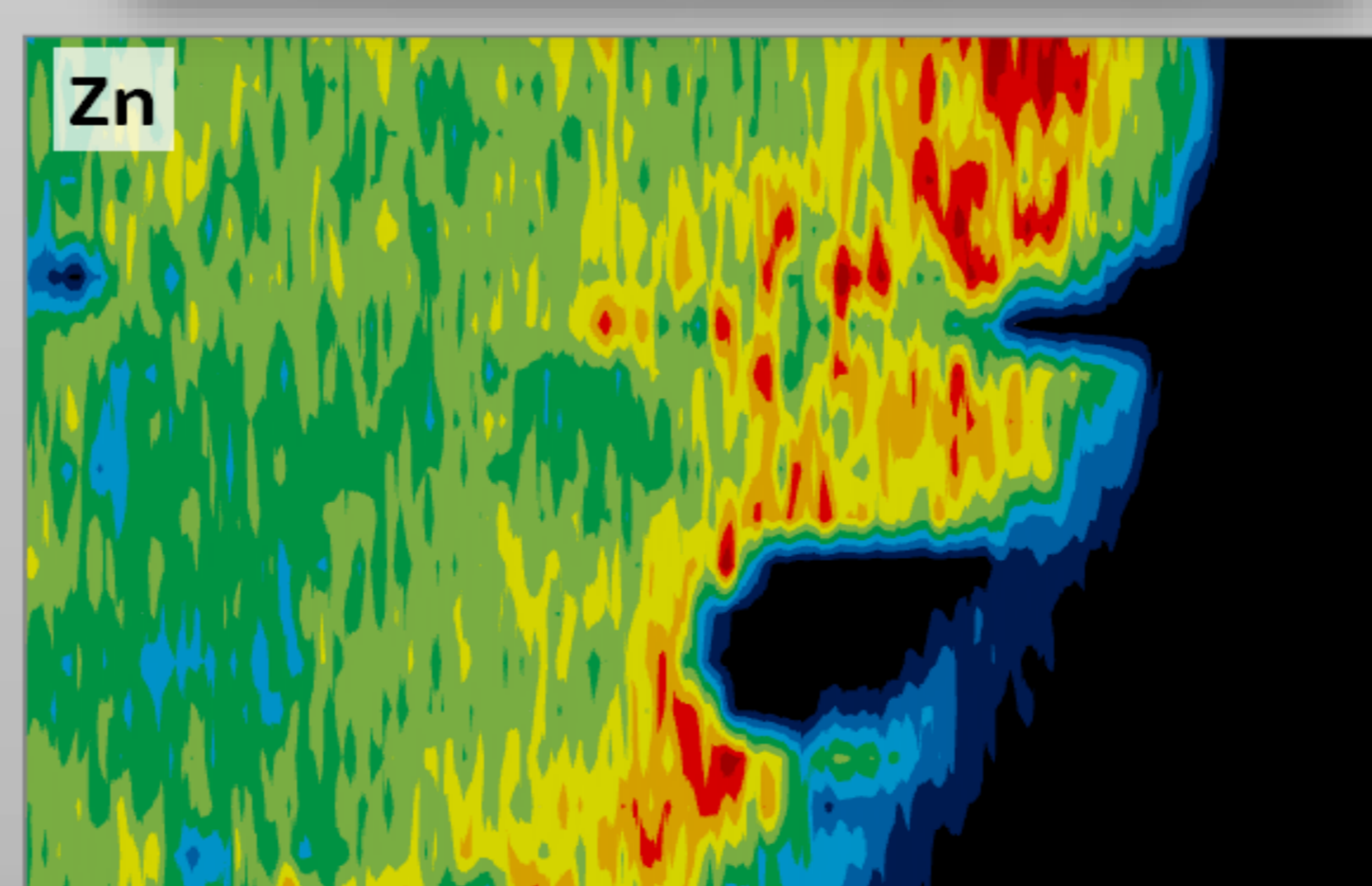


Widoczne ślady po ablacji

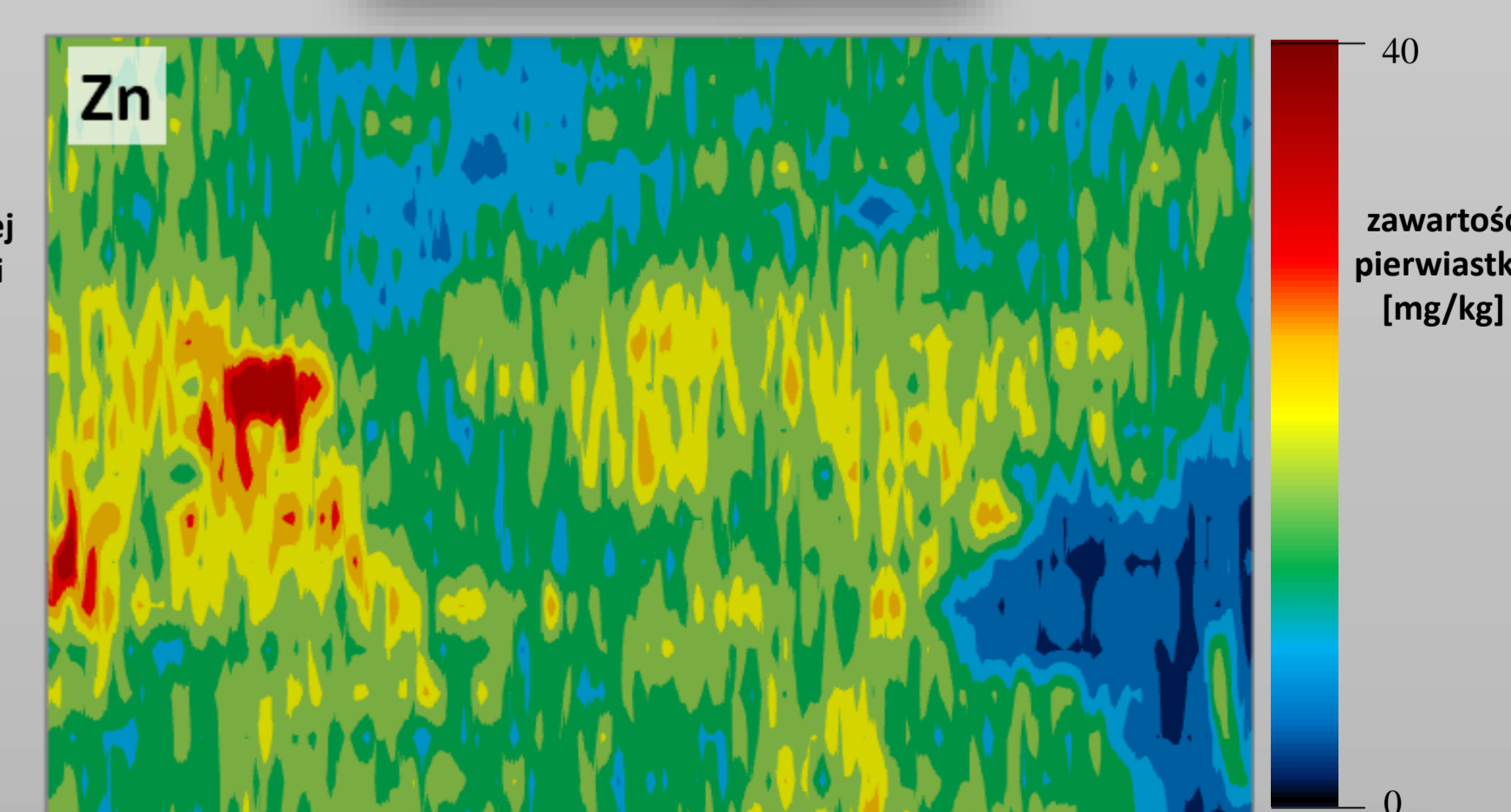
## Mapy rozmieszczenia wybranego pierwiastka we wzorcu żelatynowym oraz w próbce raka gruczołu sutkowego

Mikropróbkowaniu poddano wzorec żelatynowy naniesiony na szkiełko mikroskopowe w postaci kropli oraz guz po suszeniu przez 24h w 50°C

### Wzorec żelatynowy



### Próbka guza



## Podsumowanie

- W pracy porównano parametry analityczne uzyskane dla wzorców przygotowanych z wykorzystaniem różnych rodzajów żelatyny – odczynnikowej oraz żelatyny spożywczej. Wykazano użyteczność przygotowanych wzorców poprzez ilościowe zobrazowanie rozmieszczenia pierwiastków w guzach nowotworowych zwierząt laboratoryjnych.
- Wykonano mapy będące wizualizacją rozmieszczenia wybranych pierwiastków oraz zdjęcia mikroskopowe obrazujące widoczne ślady po mikropróbkowaniu. Badane próbki różniły się w znaczący sposób jednorodnością rozmieszczenia pierwiastków. W próbkach pobranych od zwierząt, u których zastosowano suplementację diety cynkiem i miedzią, zaobserwowano większą zawartość tych pierwiastków w porównaniu z grupą kontrolną na diecie niewzbogacanej.