

Przygotowanie próbek biologicznych i klinicznych do pomiarów metodą LA-ICP-MS

Anna Rybarczyk

Opiekun: mgr Agata Jagielska

Promotor: dr hab. Barbara Wagner

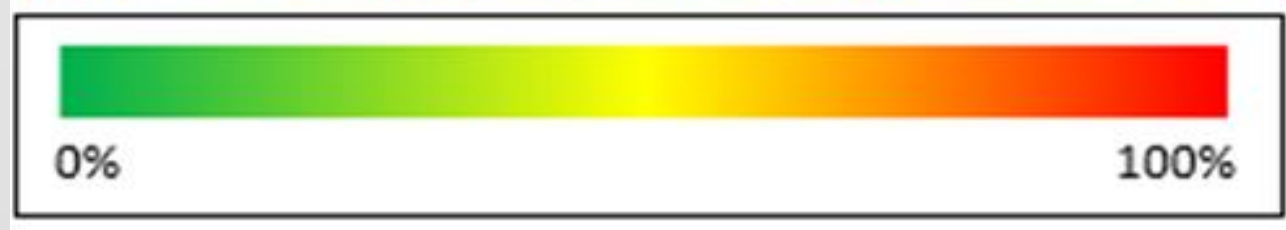
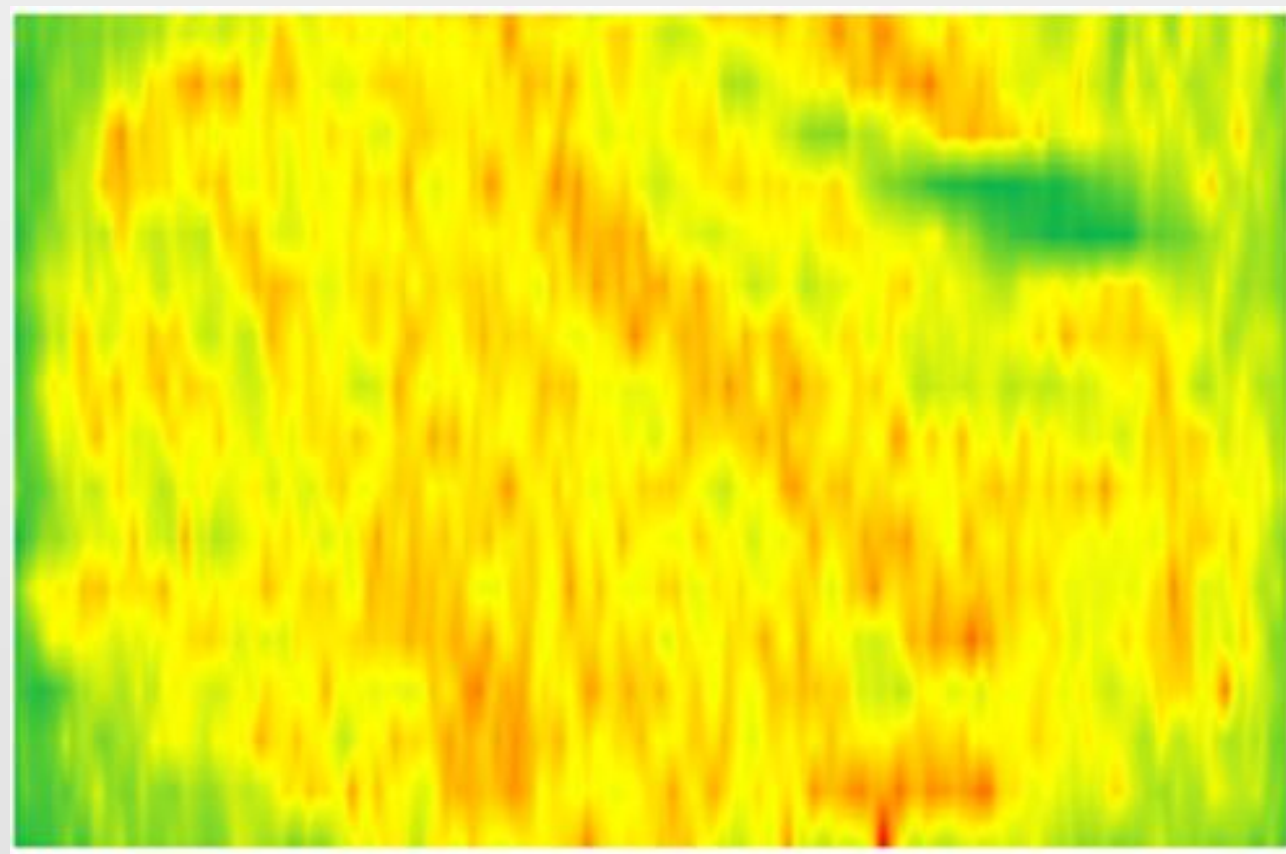
Pracownia Teoretycznych Postaw Chemii Analitycznej

Cel pracy

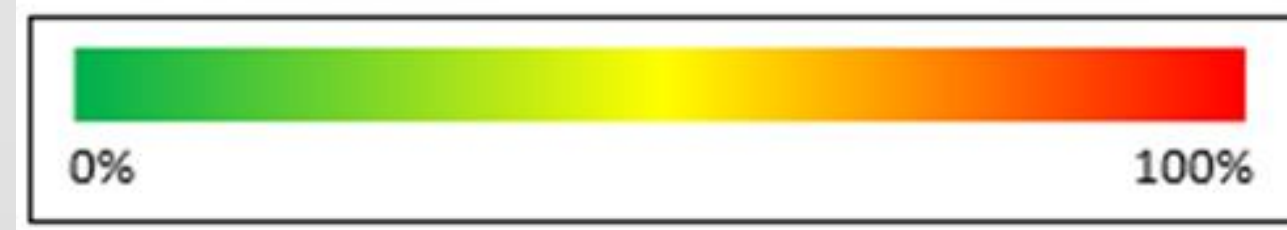
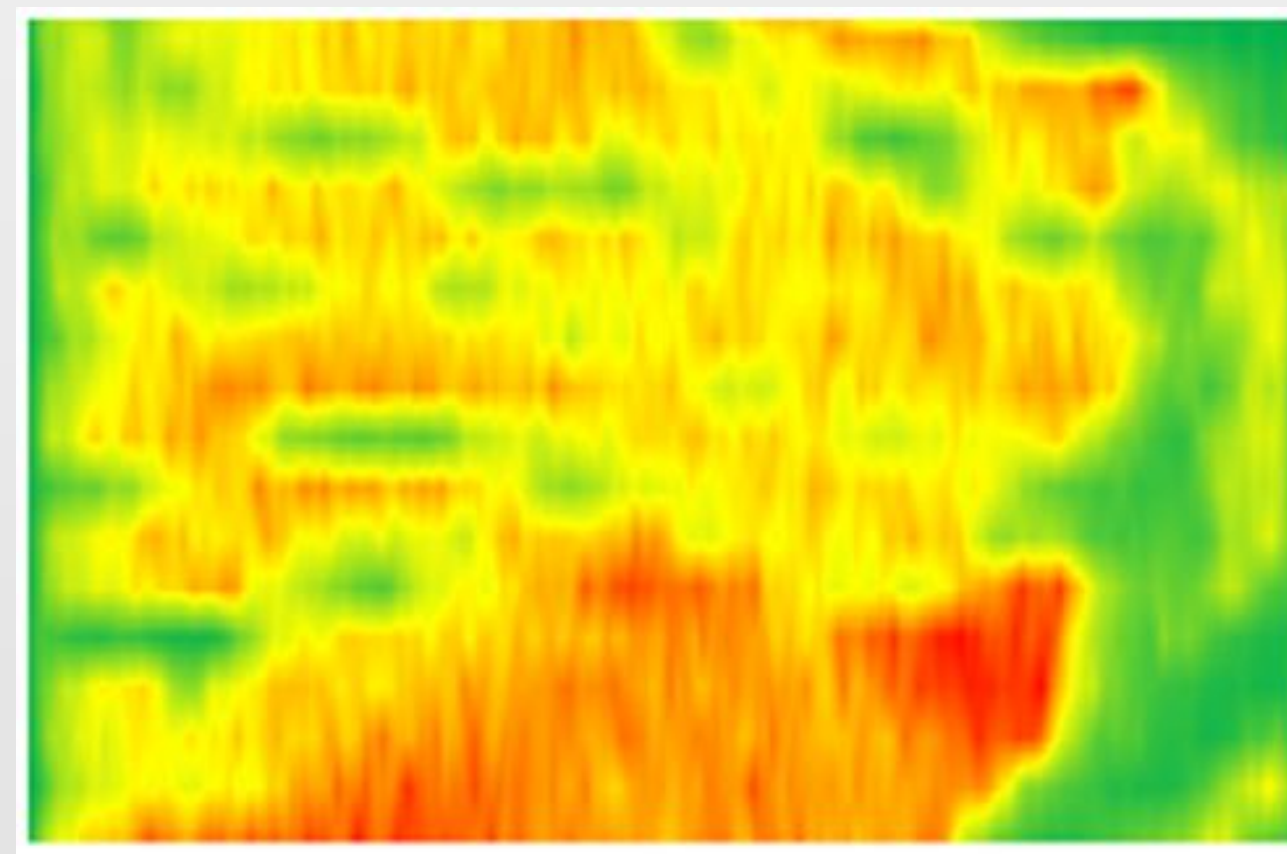
- Porównanie dwóch metod przygotowywania materiału biologicznego przed pomiarami LA-ICP-MS:
 - (i) utrwalanie formaliną i zatapianie w parafinie (ang. formalin-fixation and paraffin-embedding, FFPE) oraz
 - (ii) utrwalanie w paraformaldehydzie i krioprotekcja w sacharozie (ang. paraformaldehyde fixation and sucrose cryoprotection).
- Porównanie dwóch wzorców wewnętrznych:
 - (i) izotopu węgla ^{13}C oraz
 - (ii) izotopu złota ^{197}Au .
- Ocena stabilności wzorców żelatynowych w czasie.
- Optymalizacja doboru grubości próbki do pomiaru LA-ICP-MS.

Porównanie metod przygotowania próbek:

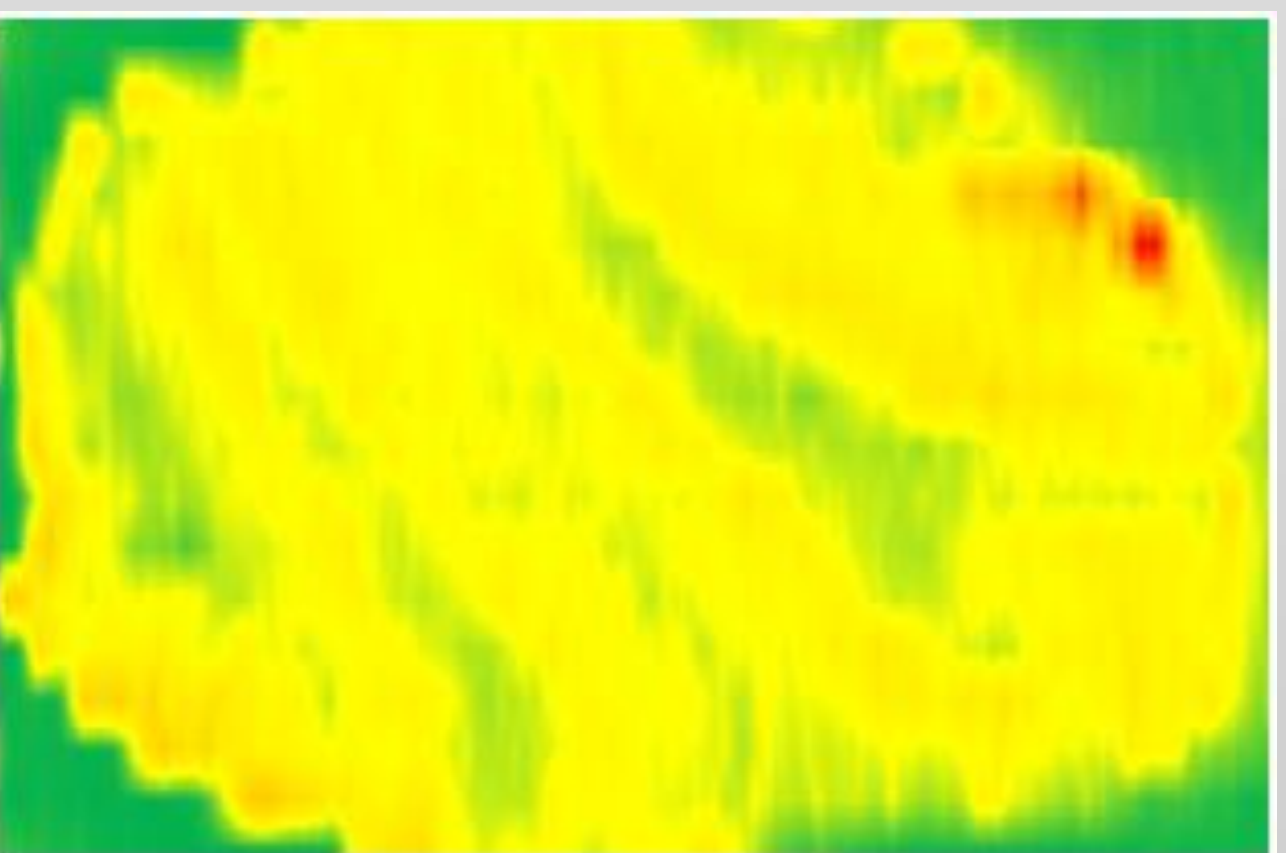
wybrane metody przygotowania próbek są stosowane w celu zapobiegania naturalnym procesom rozkładu oraz utwardzenia, które jest przydatne w późniejszym etapie cięcia tkanek.



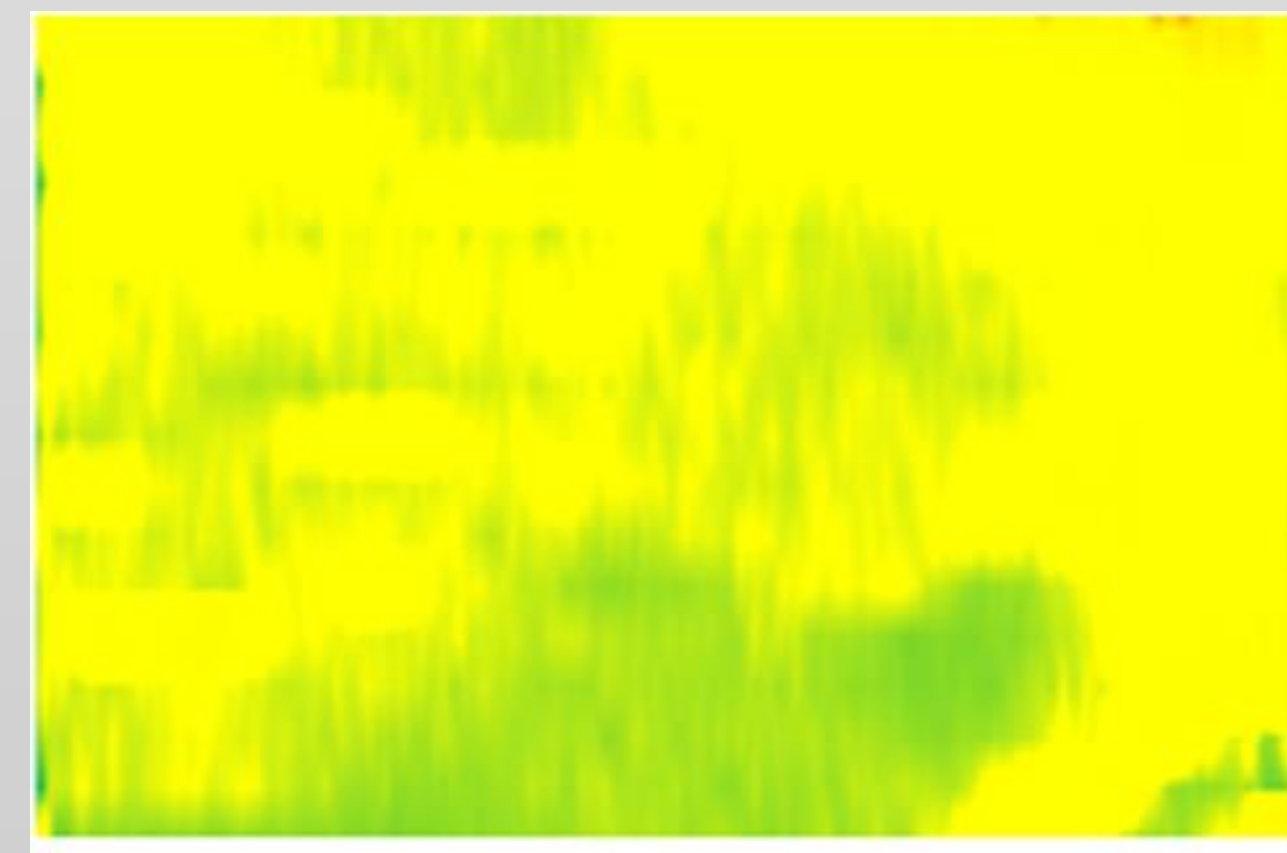
Względna mapa rozmięszczenia ^{13}C w próbce utrwalonej metodą FFPE.



Względna mapa rozmięszczenia ^{13}C w próbce utrwalonej metodą krioprotekcji w sacharozie.



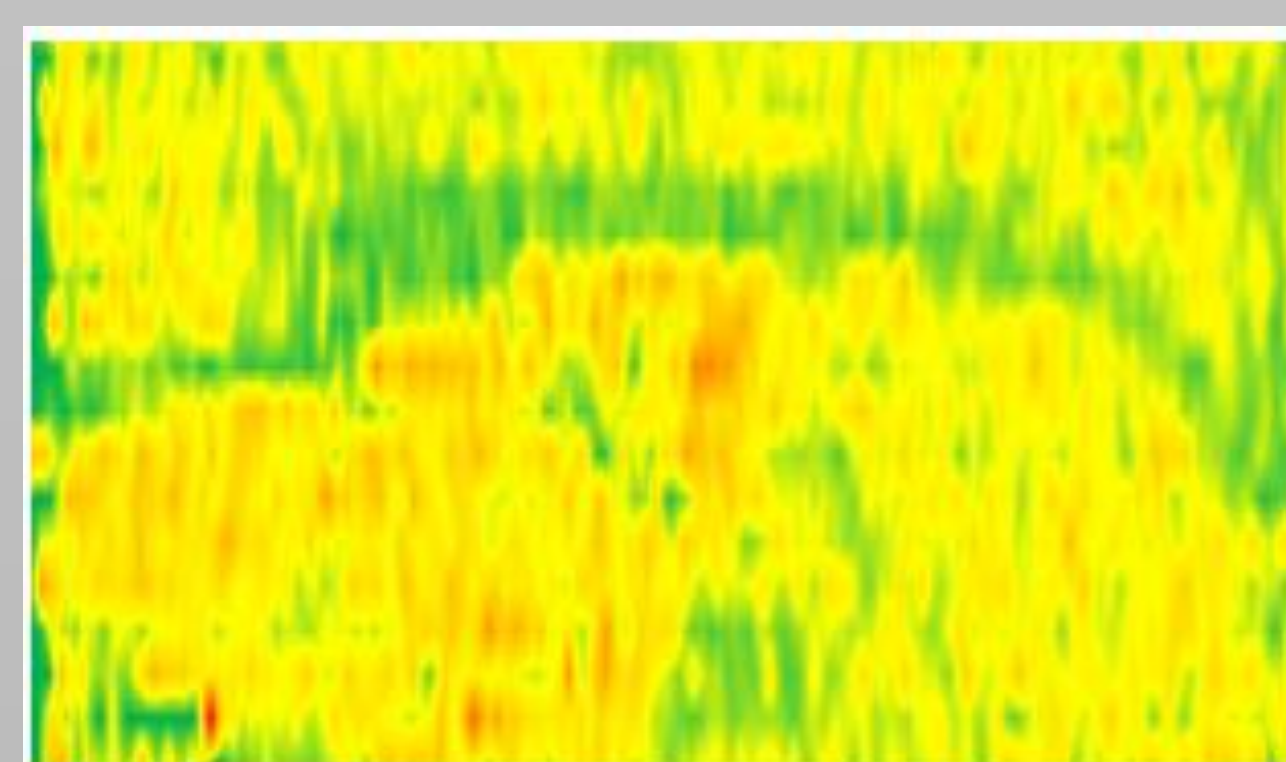
Mapa rozmięszczenia ^{23}Na w próbce utrwalonej metodą FFPE.



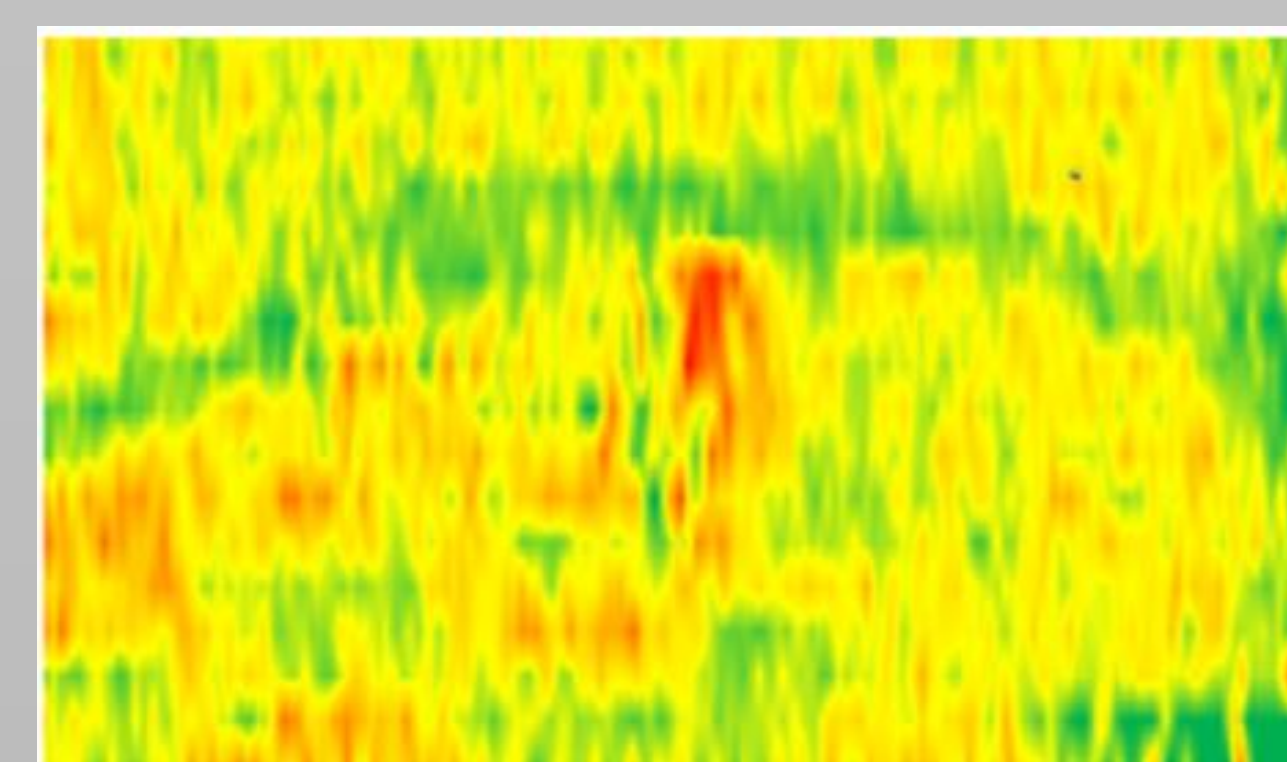
Mapa rozmięszczenia ^{23}Na w próbce utrwalonej metodą krioprotekcji w sacharozie.

• Porównanie skuteczności działania wzorców wewnętrznych

Metoda uwzględniania obecności wzorca wewnętrznego (IS –ang. Internal Standard) stosowana jest w celu kompensowania wpływu gęstości i grubości tkanki na skuteczność ablacji laserowej. W przypadku próbek biologicznych najczęściej wybierany jest izotop ^{13}C , naturalnie występujący w tkance. Innym rozwiązaniem jest napylenie cienkiej, równomiernej warstwy metalu nieobecnego pierwotnie w próbce, np. monoizotopowego złota (^{197}Au). Obie metody porównano:



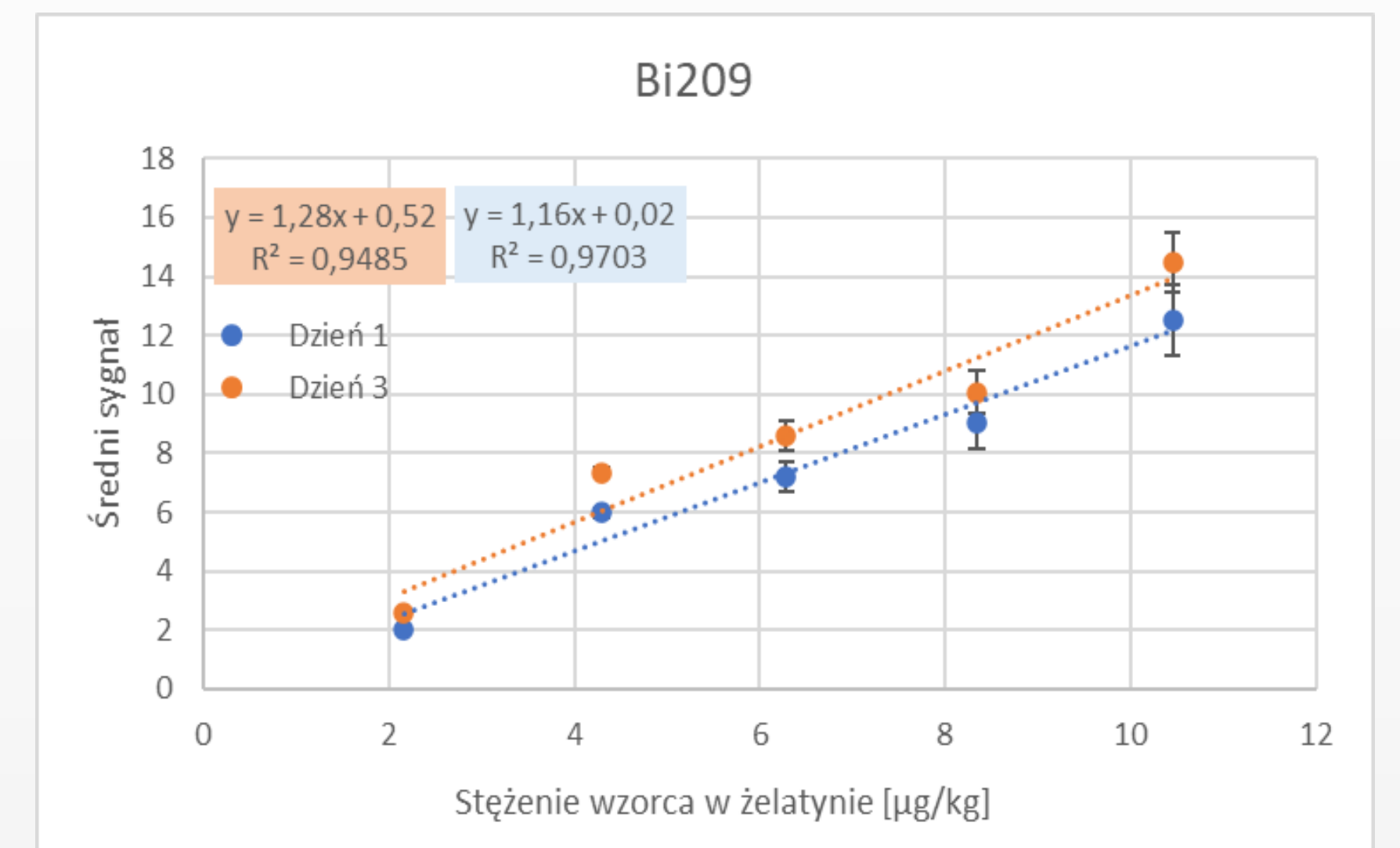
Mapa względnego rozmięszczenia ^{65}Cu w próbce hipokampu szczura. Próbką pokrytą warstwą złota (IS: ^{197}Au).



Mapa względnego rozmięszczenia ^{65}Cu w próbce hipokampu szczura. Próbką niepokrytą warstwą złota; wzorzec wewnętrzny (IS: ^{13}C).

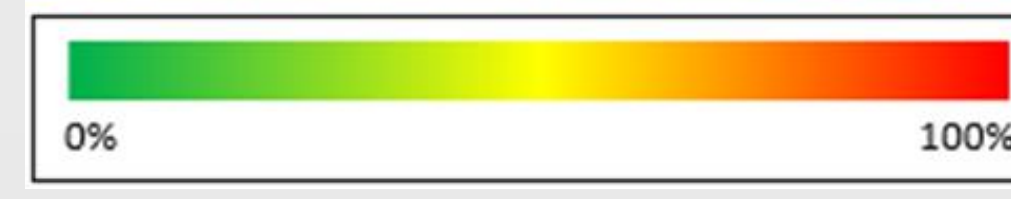
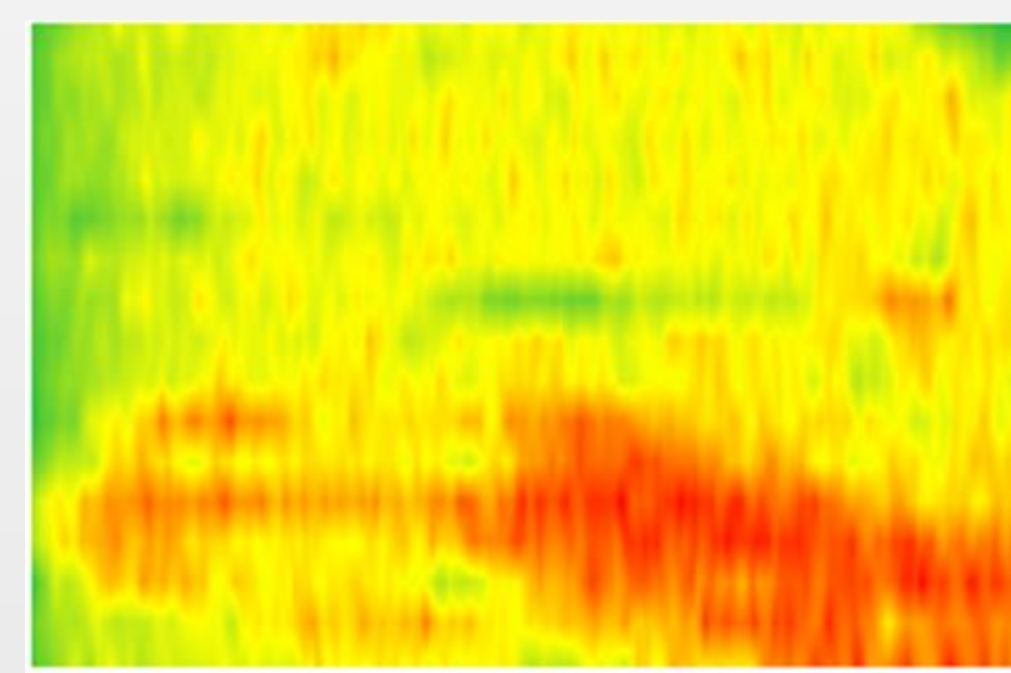
• Ocena stabilności wzorców żelatynowych w czasie.

W odstępie trzech dni porównano stabilność wzorców żelatynowych, pozwalających na utworzenie krzywej kalibracyjnej.

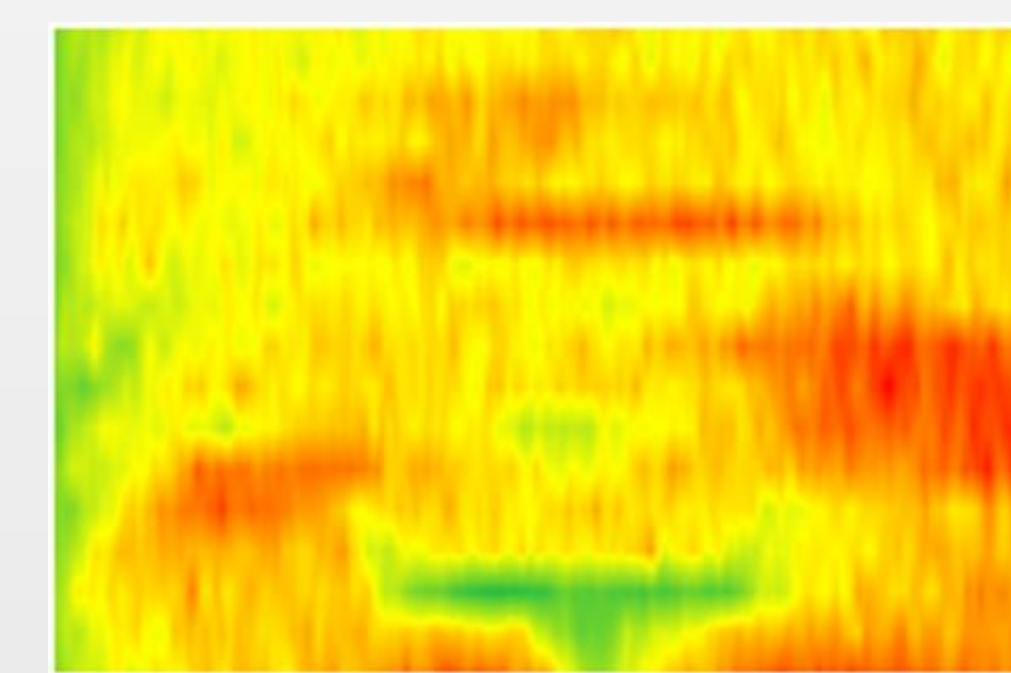


Porównanie krzywych kalibracyjnych dla ^{209}Bi .

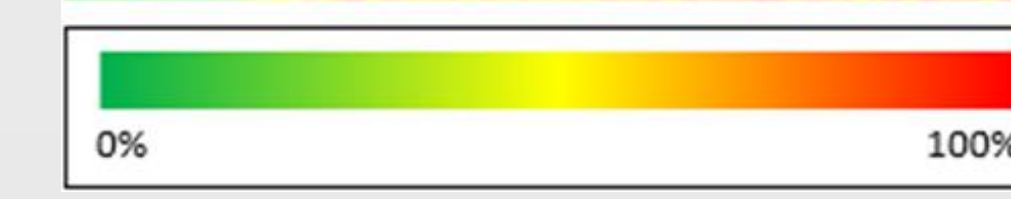
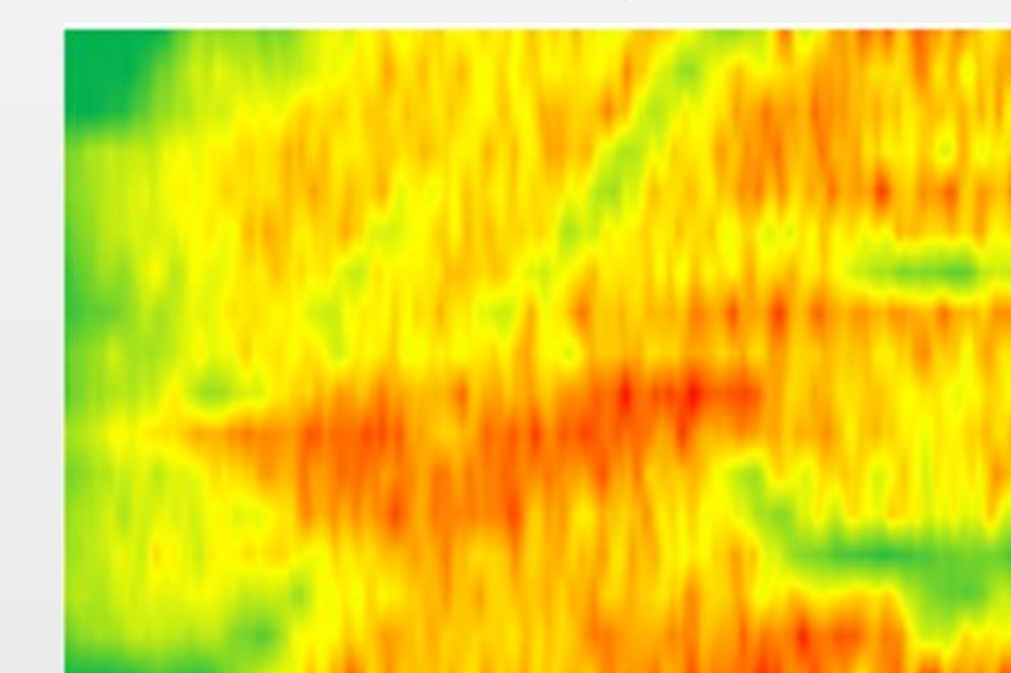
• Porównanie zachowania tkanek o różnej grubości: $d_1=15\ \mu\text{m}$, $d_2=20\ \mu\text{m}$ oraz $d_3=25\ \mu\text{m}$.



Mapa rozmięszczenia ^{13}C w próbce mózdzku ($d_1=15\ \mu\text{m}$).



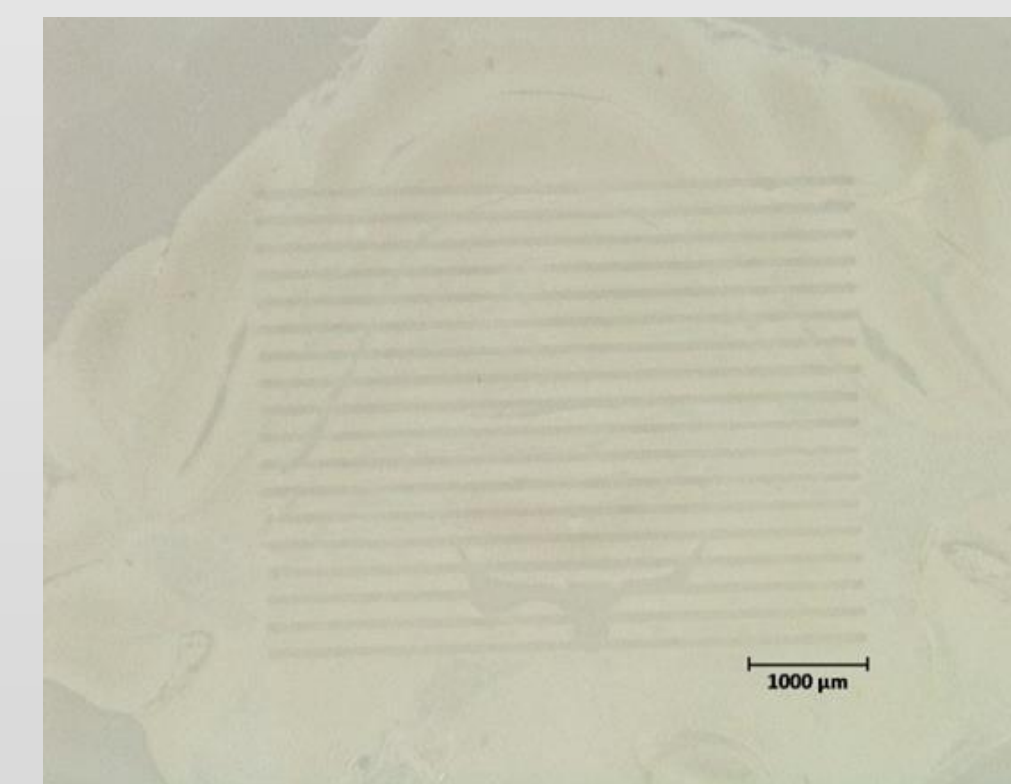
Mapa rozmięszczenia ^{13}C w próbce mózdzku ($d_2=20\ \mu\text{m}$).



Mapa rozmięszczenia ^{13}C w próbce mózdzku ($d_3=25\ \mu\text{m}$).



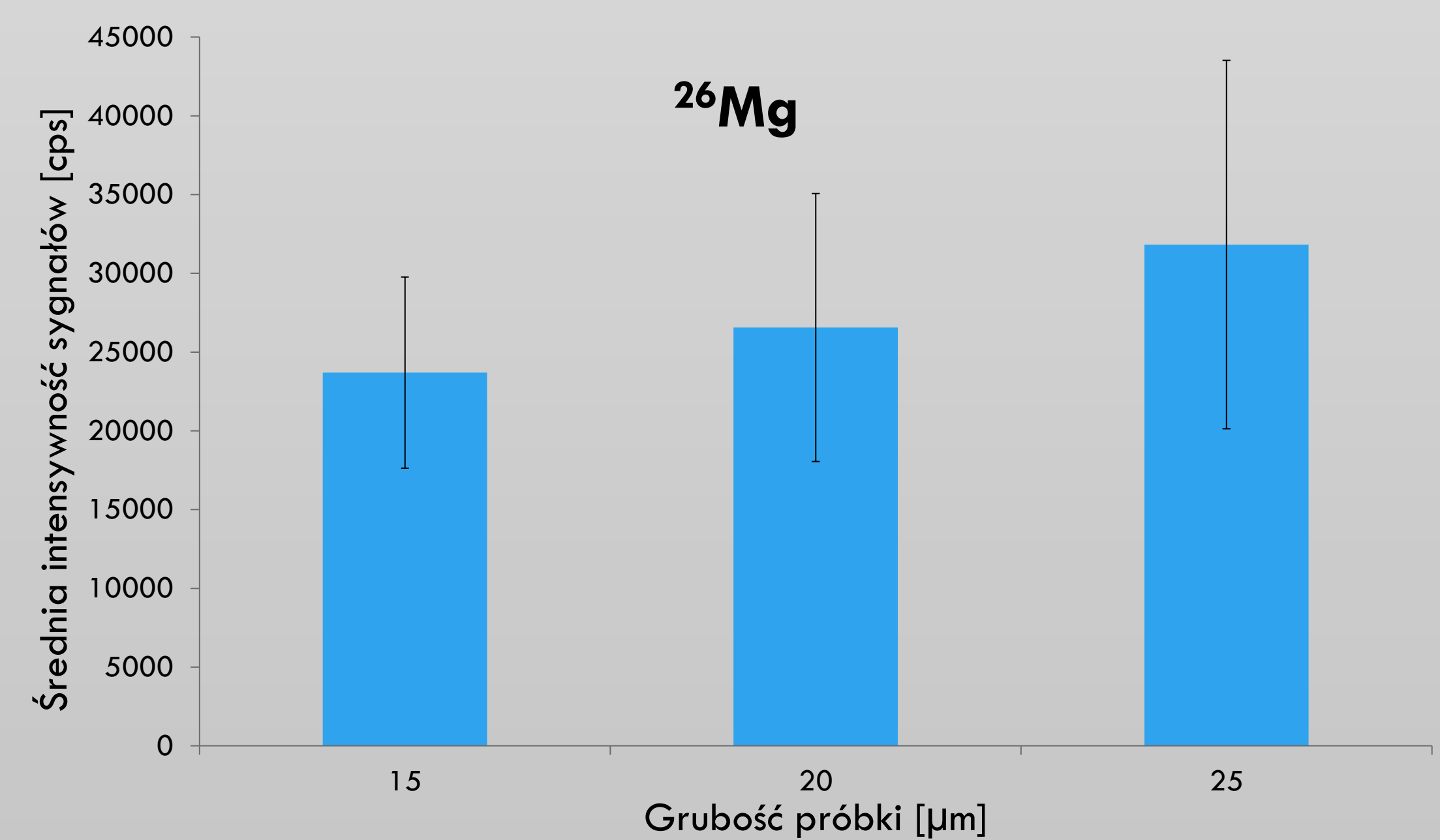
Zdjęcie próbki o grubości d_1 po ablacji laserowej.



Zdjęcie próbki o grubości d_2 po ablacji laserowej.



Zdjęcie próbki o grubości d_3 po ablacji laserowej.



Wpływ grubości próbki na intensywność sygnału zarejestrowanego dla wybranego izotopu: ^{26}Mg .

Wnioski

- możliwość mikropróbkowania większej ilości materiału do analizy, a w konsekwencji rejestrowanie wyższych intensywności sygnałów pierwiastków stanowiących cel prowadzonych badań (pomimo wyższych wartości RSD) uznano za wskazujące na zasadność wstępnego przygotowania próbek w postaci preparatów o grubości $25\ \mu\text{m}$;
- nieznacznie lepsze odwzorowanie struktur tkankowych można było zauważyć przy zastosowaniu izotopu ^{197}Au jako wzorca wewnętrznego;
- porównanie metod wstępnego przygotowania tkanek do badań LA-ICP-MS wskazywało także na nieznaczne podwyższenie wyplukiwania z materiału biologicznego pierwiastków alkalicznych (szczególnie Na) przy zastosowaniu metody krioprotekcji w sacharozie w porównaniu do metody FFPE;
- zalecane byłyby dalsze badania nad trwałością wzorców żelatynowych w czasie.

Bibliografia

- Bonta M., Török S., Hegedus B., Döme B., Anal Bioanal Chem. 2017, 409, 1805
 Bonta M., Hegedus B., Limbeck A., Anal Chim Acta. 2016, 908, 54
 Hare D. J. et al., J. Anal. At. Spectrom., 2014, 29, 565