



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Kristiina Lundgrén

# MALDI-massaspektrometrinen kuvantamisen soveltaminen syöpälääkkeiden arviointiin kudoksissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

4.12.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Kristiina Lundgrén MALDI-massaspektrometrinen kuvantamisen soveltaminen syöpälääkkeiden arviointiin kudoksissa 35 sivua + 1 liite 4.12.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	Dosentti Maciej Lalowski Lehtori Miika Kuivikko
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Helsingin yliopiston Medicumin Lääketieteellisillä laitoksilla, Kliinisen Proteomiikan yksikössä, Helsingissä.</p> <p>Opinnäytetyön yleisenä tavoitteena oli määritellä tarkat olosuhteet optimaaliselle lääkkeen tunkeutumiselle ja havaitsemisherkkyydelle käyttämällä MALDI-massaspektrometriakuvannus (MSI) -lähestymistapoja. Tätä tarkoitusta varten Pfizer Compound Transfer -ohjelman kautta saatiin kahdeksan kehitteillä tai kliinisessä käytössä olevaa antineoplastista yhdistettä, joita käytettiin tässä opinnäytetyössä.</p> <p>Projekti toteutettiin tutkimalla antineoplastisten yhdisteiden spektriominaisuuksia käyttämällä kolmea MALDI-matriisia: alfa-syano-4-hydroksikaneelihappoa (CHCA), sinapiinihappoa (SA) ja 2,5-dihydroksibentsoehappoa (DHB).</p> <p>Koska biologisen kudoksen läsnäolo häiritsee MALDI-ionien ionisaatiotehokkuutta, käytettiin strategiaa, jossa yhdisteet lisättiin kudost materiaaliin, kudosten häiriöiden jäljittelemiseksi yhdisteen spektriominaisuuksiin. Kahdeksan yhdisteen tunnetut konsentraatiot lisättiin tunnettuihin määriin kudost materiaalia, joka jauhettiin nestemäisessä N<sub>2</sub>-lämpötilassa käyttämällä Retsch Cryomill -laitetta.</p> <p>MSI:tä käytettiin arvioimaan yhdisteiden spektriominaisuuksia kudostaustalla. Tätä tarkoitusta varten "terästetyt" kudostlohkot leikattiin 12 µm:n paksuisiksi kryostaatilla ja kiinnitettiin sulattamalla indiumtinaoksidilla (ITO) päällystetyille MALDI-kohdelasille. CHCA-matriisi suihkutettiin näytteille iMatrixSpray-instrumentilla ja analysoitiin UltrafleXtreme MALDI -spektrometrillä. Mittaukset suoritettiin Reflectron MS- ja LIFT MS / MS-moodissa ehjän yhdisteen ja sen fragmenttien spektriominaisuuksien määrittämiseksi. Kahdeksasta lähtöyhdisteestä kolme valittiin niiden optimaalisten ionisointiominaisuuksien perusteella perfluusioparadigmassa käytettäväksi.</p> <p>Hyödyntämällä tätä kokeellista tutkimusstrategiaa, perfluusoina rotan maksaan 2,5 µM, Sunitinib ja sen spesifiset fragmentit (MS- ja LIFT MS / MS-moodissa) olivat selvästi nähtävissä. Nämä tulokset ovat lähtökohtana tuleville tutkimuksille, joissa tutkitaan antineoplastisten yhdisteiden tunkeutumista kasvaimiin analysoimalla koskemattoman yhdisteen ja sen metaboliittien paikallinen sijainti.</p>	
Avainsanat	MALDI-TOF, MALDI-MSI, antineoplastiset yhdisteet, jyräjän maksakudos

Author Title Number of Pages Date	Kristiina Lundgrén Application of MALDI-Mass Spectrometry Imaging for Assessment of Antineoplastic Compounds in Tissue 35 pages + 1 appendix 4 December 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Degree Programme in Laboratory Sciences
Instructors	Maciej Lalowski, Ph.D., Adjunct Professor Miika Kuivikko, Senior lecturer
<p>The practical work described in this thesis was performed at the Meilahti Clinical Proteomics Core Facility; Medicum, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland.</p> <p>The overall aim of the thesis study was to define precise conditions for optimal drug penetration and detection sensitivity using MALDI mass spectrometry imaging (MSI) approaches.</p> <p>For this purpose, eight antineoplastic compounds under development or in clinical use were obtained via a Pfizer Compound Transfer program and utilized in this thesis study.</p> <p>The project was carried out by investigating the spectral properties of the antineoplastic compounds utilizing three MALDI matrices, namely alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid (SA) and 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB).</p> <p>As the presence of biological tissue interferes with the ionization efficiency of MALDI ions (due to background signals, lipid concentration and quenching effects) a strategy employing the spiking of compounds on tissue material was utilized to mimic the interference of tissues on the compound spectral properties. Known concentrations of the eight compounds were spiked into known amounts of tissue material ground at liquid N<sub>2</sub> temperature utilizing a Retsch Cryomill.</p> <p>MSI was utilized to assess the spectral properties of the compounds in tissue backgrounds. For this purpose, the blocks of “spiked tissues” were cut on a cryostat at 12 µm thickness and thaw-mounted onto indium tin oxide (ITO)-coated MALDI target slides. CHCA matrix was sprayed onto the samples using an iMatrixSpray instrument and analyzed with an UltrafleXtreme MALDI mass spectrometer. Measurements were performed in Reflectron MS and LIFT MS/MS modes to determine the spectral properties of the intact compound and its fragments. Of the eight starting compounds, three were selected on the basis of their optimal ionization properties to be employed in a perfusion paradigm.</p> <p>Utilizing this experimental pipeline, a concentration of 2.5 µM of Sunitinib and its specific fragments (in MS and LIFT MS/MS modes) perfused into rat liver was clearly visible. These results serves as a basis for future studies investigating the penetration of anti-neoplastic compounds in tumors analyzing the spatial localization of the intact compound and its metabolites.</p>	
Keywords	MALDI-TOF, MALDI-MSI, antineoplastic compounds, rodent liver tissue

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Massaspektrometria	1
2.1	Näytteen syöttö	2
2.2	Ionilähde	2
2.2.1	Sähkösumutusionisaatio	2
2.2.2	Sekundaarinen ionimassaspektrometria	3
2.2.3	Desorptio-sähkösumutusionisaatio	4
2.3	Massa-analysaattori	5
2.3.1	Lineaarinen kvadrupoli	5
2.3.2	2D-ioniloukku	6
2.3.3	3D-ioniloukku	7
2.3.4	Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssianalysaattori	8
2.3.5	Orbitrap	8
2.4	Detektori	9
3	Matriisiavusteinen laserdeserptio-ionisaatio, MALDI	11
3.1	Matriisi	11
3.2	Ionisaattori	12
3.3	Lentoaikamassaspektrometria, TOF	12
4	Elektronimikroskopia	13
5	Kemikaalit ja laitteistot	14
5.1	Käytetyt reagenssit	15
5.2	Laitteet ja välineet	15
5.3	Näytteenkäsittely ja mittausmenetelmät	16
5.3.1	Lääkeaineiden liuotus ja laimennos	18
5.3.2	Maksojen perfusointi	19
5.3.3	Jauhettujen kudoksenäytteiden valmistaminen	20
5.3.4	Kudosten leikkaaminen	21
5.3.5	Näytteen valmistelu MALDI-kvantamiseen	22
5.3.6	MALDI-kvantaminen	22
5.3.7	Näytteen valmistelu elektronimikroskoopille	24

6	Tulokset	24
7	Tulosten tulkinta	32
	Lähteet	34

#### Liitteet

Liite 1. Matriisien vertailuanalyysi

## Lyhenteet

ACN	Asetonitrile, asetonitrilli.
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, $\alpha$ -syaani-4-hydroksikanelihappo.
Da	Dalton, molekyylimassan yksikkö.
DC	Direct current, tasavirta.
DESI	Desorption electrospray ionization, desorptio-sähkösumutus-ionisaatio.
DHB	2, 5-Dihydroxybenzoic acid, 2, 5-dihydroksibentsoehappo.
DMSO	Dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi.
EM	Electron multiplier, elektronimonistin.
ESI	Electrospray ionization, sähkösumutus-ionisaatio.
EtOH	Ethanol, etanoli.
FT-ICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance, Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssianalysointilaitte.
FT-OT	Orbitrap, kiertoloukku.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
ITO	Indium tin oxide, indiumtinaoksidi.
LIT	Linear ion trap, lineaarinen ioniloukku.
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization. Matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio.

MS	Mass Spectrometry, massaspektrometria.
MSI	Mass Spectrometry Imaging, massasektrometrinen kuvantaminen.
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry, tandemmassaspektrometria.
PBS	Phosphate-buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos.
RF	Radio frequent, radiotaajuus.
SA	Sinapinic acid, sinapiinihappo.
SEM	Scanning electron microscopy, pyyhkäisyelektronimikroskopia.
SIMS	Secondary-ion mass spectrometry, sekundaarinen ionimassaspektrometria.
TEM	Transmission electron microscopy, läpäisyelektronimikroskopia.
TFA	Trifluoroacetic acid, trifluorietikkahappo.
TOF	Time of flight, lentoaika.

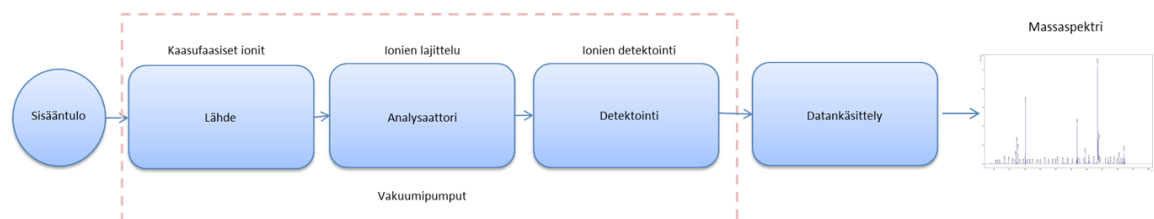
## 1 Johdanto

Matriisiavusteinen lasersorptioionisaatio-kuvantaminen (MALDI-MSI) on tekniikka pienimolekyylisten yhdisteiden visualisoimiseksi kudoksissa. MALDI-MSI:sta on tullut standardimenetelmä lääkejakautumisen tutkimuksille, ja se on myös integroitumisprosessi kliiniseen rutiiniin. MALDI-MSI:n herkkyys on pikomolaarisissa pitoisuuksissa ja resoluutio alimmillaan 50 mikrometriä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli visualisoida valittujen syöpälääkkeiden jakautuminen kudoksiin kvantitatiivisella tavalla käyttämällä MALDI-kuvantamista ja leimattomia massaspektrometrisiä lähestymistapoja spesifisessä rotan perfuusiomallissa.

## 2 Massaspektrometria

Massaspektrometria (MS) on monipuolinen ja tehokas analyttinen tekniikka, jota käytetään kvalitatiivisen ja semi-kvantitatiivisen molekyyllisältöön liittyvän informaation keräämiseen, mittaamalla kaasufaasi-ionien massan ja varauksen välinen suhde ( $m/z$ ). Näytteessä olevat molekyylit ionisoidaan ja ohjataan, sähkömagneettisia kenttiä hyväksi käyttäen, kohti detektoria, jossa ne tunnistetaan suhteellisen intensiteetin ja fyysisten ominaisuuksien mukaan, määrittäen niiden tarkan massan ja karakterisoiden niiden rakennetta ja määrää. [1;2.] Tulos esitetään massaspektrin muodossa. Jokainen massaspektrometri voidaan jakaa viiteen perusosaan (kuva 1): näytteensyöttö, ionisaation lähde, massa-analysaattori, detektori ja tietojen käsittely.



Kuva 1. Massaspektrometrin osat vasemmalta oikealle: sisääntulo, lähde, analysaattori, detektori, datankäsittely ja lopputuloksena massaspektri. Lähde, analysaattori ja detektori ovat vakuuimissa.



## 2.1 Näytteen syöttö

Näytteensyöttömenetelmään vaikuttaa näytteen ominaisuudet ja sen käsittely ennen MS-analyysiä. Nestemäiset ja kaasumaiset näytteet voidaan injektoida suoraan, kun taas kiinteät näytteet voidaan joko sijoittaa koettimeen ja lämmittää sähkövastuksella sublimoitumisen helpottamiseksi tai ne voidaan muuntaa kaasumaiseen ionifaasiin muilla tekniikoilla. Massaspektrometri voidaan myös kytkeä toisen erottelu tekniikka, kuten kaasu- tai nestekromatografian jatkoksi. Tämä helpottaa monimutkaisten näytteiden analysointia ja parantaa spesifisyyttä. [3.]

## 2.2 Ionilähde

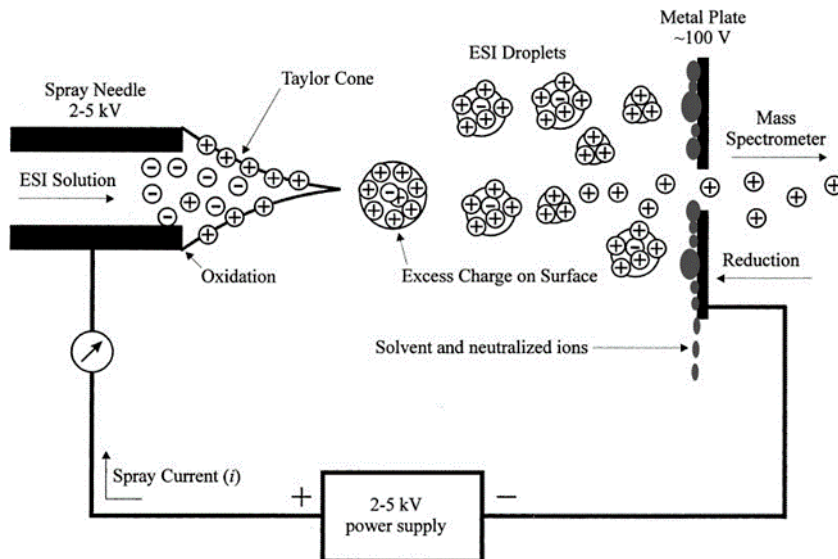
Ionilähteen tehtävänä on muuntaa näyte varautuneeseen/ionisoituneeseen kaasumaiseen muotoon. Ionilähteitä on erilaisia, ja siksi näytteen ominaisuuksista täytyy tuntea perusasiat, jotta voidaan valita sopivin tekniikka. Esimerkiksi kemiallinen ja elektroni-ionisaatio ovat sopivampia lämpöstabiileihin kaasumaisiin näytteisiin, kun taas ne eivät ole optimaalisia termisesti epästabiileille näytteille. Jotkut ionisaatiotekniikat ovat erittäin energisiä ja edistävät laajaa fragmentoitumista (ns. kova ionisaatio, esim. elektroni-ionisaatio), kun taas toiset tuottavat molekyyli-ioneja tai niiden addukteja ilman fragmentteja (ns. pehmeä ionisaatio, esim. sähkösumutus-ionisaatio).

### 2.2.1 Sähkösumutus-ionisaatio

Sähkösumutus-ionisaatio (ESI) otettiin ensimmäisen kerran käyttöön vuonna 1968 [4], ja Yamashita ja Fenn yhdistivät sen MS:iin vuonna 1984 [5]. Se mahdollistaa monivarauksellisten ionien muodostumisen, protonien lisäämisen ansiosta. ESI on ns. pehmeä ionisaatiomenetelmä: heikot sidokset usein säilyvät ja näin sitä voidaan käyttää ehjien, translaation jälkeen modifioitujen peptidien tai proteiinien analysointiin. Sillä on korkea ionisaatiotehokkuus, se on yhteensopiva korkean erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC) kanssa ja sitä käytetään tällä hetkellä kaikkien yleisten massa-analysaattorien kanssa. [4.]

Näyte liuotetaan veden ja orgaanisen liuottimeen (yleensä metanolin, isopropanolin tai asetonitriliin), joka kulkee korkean positiivisen potentiaalilin (3 000 – 6 000 V) omaavan

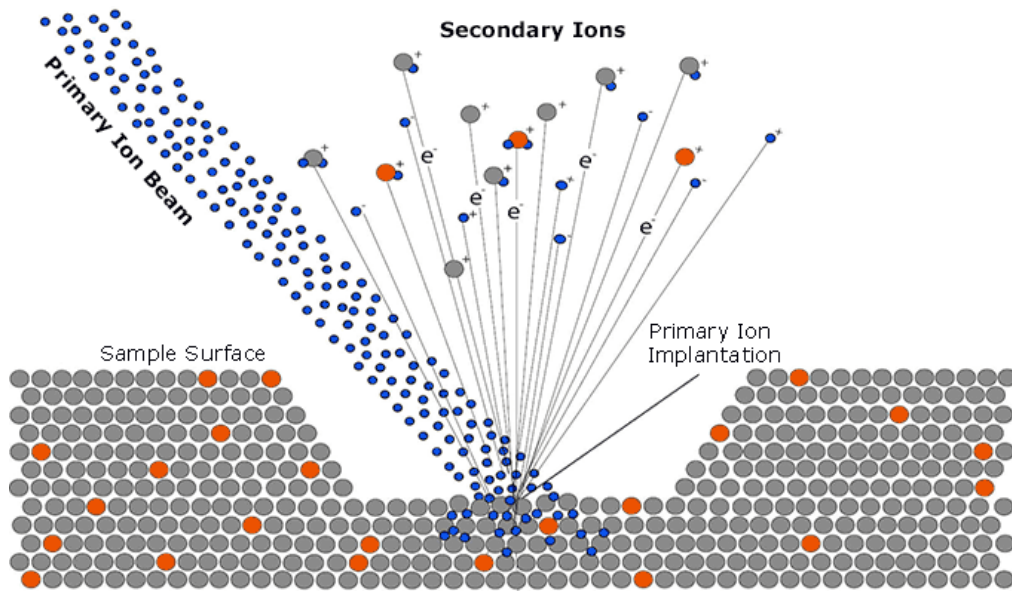
neulan läpi [5]. ESI:n putkimainen suutin on varattu niin suurella jännitteellä, että siihen saadaan nesteen pintajännityksen avustuksella muodostumaan Taylorin kartio (kuva 2), joka mahdollistaa pisaroiden muodostumisen [7]. Kun pisarat kutistuvat, varauspitoisuus pisaroissa kasvaa. Kun neste saavuttaa kynnyksjännitteen, ionit poistuvat kaasufaasiin (desorboituvat). Tätä prosessia voidaan avustaa vastavirran kuivalla kaasulla, yleensä typpellä, joka haihduttaa liuottimen [8].



Kuva 2. Sähkösumutusionisointiprosessin kaavakuva, jossa esitetään Taylorin kartion synty, pisaroiden muodostuminen, ionien desorptio ja niiden johtaminen aukon läpi massa-analysaattorille [6].

## 2.2.2 Sekundaarinen ionimassaspektrometria

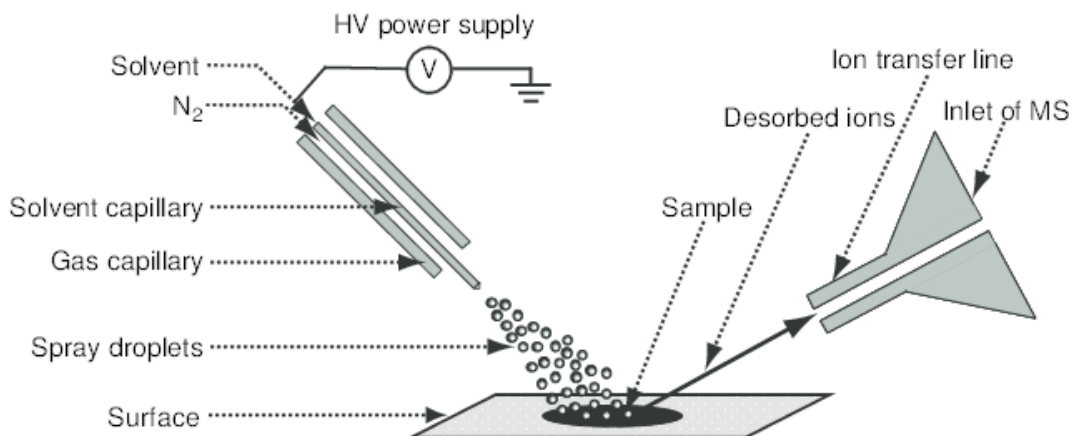
Sekundaarinen ionimassaspektrometria (SIMS) on ionisoitujen hiukkasten massaspektrometria. Nämä hiukkaset emittoituvat, kun näytteen pintaa pommitetaan energisillä primäärihiukkasilla, yleensä ioneilla kuten  $\text{Ar}^+$ ,  $\text{Ga}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  [9]. Nämä poistuvat sekundaariset hiukkaset voivat olla ioneja, neutroneja tai molekyyliä riippuen primäärisäteen ionien varauksesta. Niiden saavuttua detektorille, ne havaitaan erikseen ja ilmoitetaan niiden massa-varaus- suhteen mukaan. Kuvassa 3 on esitetty edellä selitetty SIMS-ionisaatioprosessi.



Kuva 3. SIMS-ionisaatioprosessin kaavamainen esitys [10].

### 2.2.3 Desorptio-sähkösumutus-ionisaatio

Desorptio-sähkösumutus-ionisaatio (DESI) koostuu korkeajännitesuihkekapillaarista ja koaksiaalisesta kapillaarista, joka työntää sumuttimeen kaasua. Koska suihkuneula on suunnattu näytettä kohti, näyte desorboituu ja se tulee massaspektrometrin aukon läpi (kuva 4). Tämä tekniikka mahdollistaa teoreettisesti minkä tahansa pinnan korkean suorituskyvyn analyysin ilman mitään näytteen esivalmistelua [11].



Kuva 4. Kaavio DESI-ionisaatioprosessista [12].

DESI:ssä on kahden tyyppistä ionisaatiomekanismia, yksi joka koskee pienimolekyyllipainoisia molekyyliä ja toinen suurimolekyyllipainoisia molekyyliä.

Korkean moolimassan molekyylit, kuten proteiinit ja peptidit, osoittavat sähkösuihkun kaltaisia spektrejä, joissa havaitaan moninkertaisesti varautuneita ioneja. Tämä viittaa analyysin desorptioon, jossa pisaroiden useita varauksia voidaan helposti siirtää analyysille. Pienimolekyylipainoisilla molekyyleillä ionisoituminen tapahtuu varauksensiirrolla: elektroni tai protoni.

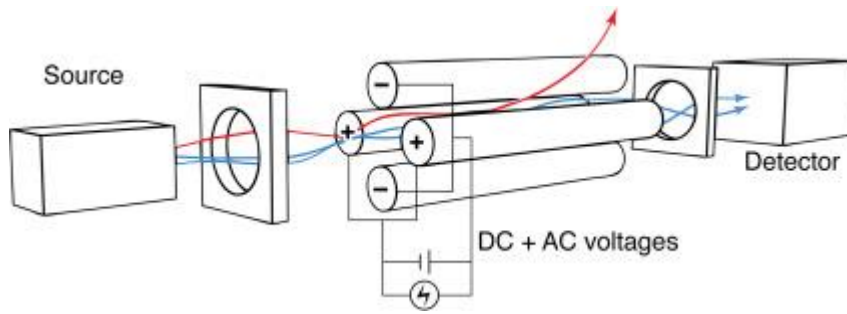
### 2.3 Massa-analysaattori

Massa-analysaattori erottaa ionilähteestä saadut ionit fysikaalisten ominaisuuksien mukaan, jotka ovat kytköksissä niiden massa-varaussuhteeseen ( $m/z$ ). Kaikki tällä hetkellä käytössä olevat massa-analysaattorit perustuvat sähkömagneettisuuteen, joten ioneja vaaditaan erottamisen aikaansaamiseksi, koska sähkömagneettiset kentät eivät vaikuta neutraaleihin molekyyleihin. [13.]

Massa-analysaattorit vaativat korkeita tyhjiötasoja toimiakseen ennustettavalla ja tehokkaalla tavalla. Ionin eristys- ja erotusprosessit massan ja varauksen suhteen perusteella vaativat tutkittavien analyttien ionien käyttäytymisen tavalla, jota instrumentin sähköstaattiset komponentit voivat ennakoitavasti hallita ja vaikuttaa siihen. Ioneja on ohjattava spektrometrin läpi tietyllä reitillä, johon vaikuttaa vain sähkö-, magneetti- ja/tai radiotaajuuskenttien asettaminen.

#### 2.3.1 Lineaarinen kvadrupoli

Lineaarinen kvadrupoli hyödyntää ioniradan stabiilisutta värähtelevissä sähkökentissä ionien erottamiseksi niiden  $m/z$ -suhteiden mukaan. Se käyttää tasavirta- (DC) ja radiotaajuus (RF) -potentiaalien yhdistelmää. Neljä yhdensuuntaista sauvaa on järjestetty symmetrisesti vastakkaisten tankojen ollessa kytkettyinä sähköisesti pareittain. [14.] Kuvassa 5 havainnollistetaan, että kahdessa parissa on yhtä suuret potentiaalit mutta eri merkkiä.

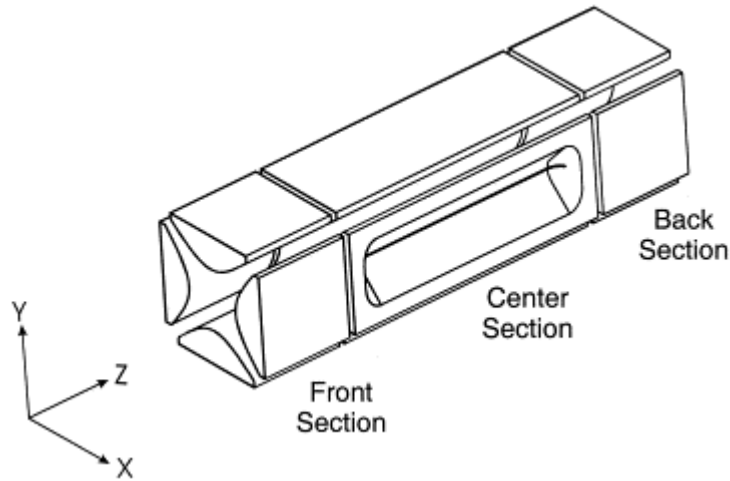


Kuva 5. Kvadrupolimassa-analysaattori [15].

Instrumentin lähteessä tuotetut ionit keskitetään ja kuljetetaan kvadrupolitankojen keskustaa pitkin. Niiden liike on riippuvainen sähkökentistä siten, että vain tietyllä  $m/z$ -alueella olevilla ioneilla on vakaa värähtelyrata ja vain ne saavuttavat ilmaisimen. Epävakaat ionit päinvastoin osuvat tankoihin, eikä niitä havaita. Skannauslinjan suunnittelu muuttamalla potentiaalit ajassa antaa vain yhden ionin kulkea kerrallaan. Ihanteellisen skannauslinjan kulmakertoimen tulisi kulkea kaikkien erilaisten stabiilisuusalueiden läpi, erottaen kaikki ionit. Menetelmän massa-alueeseen ja erottelukykyyhin vaikuttaa myös tankojen pituus ja halkaisija. [16.]

### 2.3.2 2D-ioniloukku

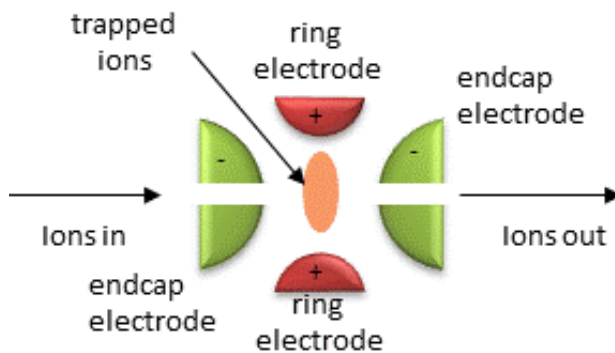
2D-ioniloukku, jota kutsutaan myös lineaariseksi ioniloukuksi (LIT), koostuu neljästä sauvamaisesta kvadrupolista, joka päättyy linsseihin, jotka heijastavat ioneja eteenpäin ja taaksepäin (kuva 6). 2D-ioniloukuilla on korkea ionien varastointikapasiteetti (10 kertaa enemmän 3D-ioniloukkoon nähden) ja parannettu herkkyys, koska ionit ovat keskittyneet keskilinjaan eikä pisteeseen ja ne voidaan karkottaa loukusta molemmilla akseleilla. LIT:iä voidaan käyttää myös ionien keräämiseen ja lämpökäsittelyyn (käyttämällä puskurikaasua, kuten argonia), jotta kineettinen energia olisi kapeampi ennen erotusta. [17.]



Kuva 6. Lineaarisen ioniloukun perusosat [18].

### 2.3.3 3D-ioniloukku

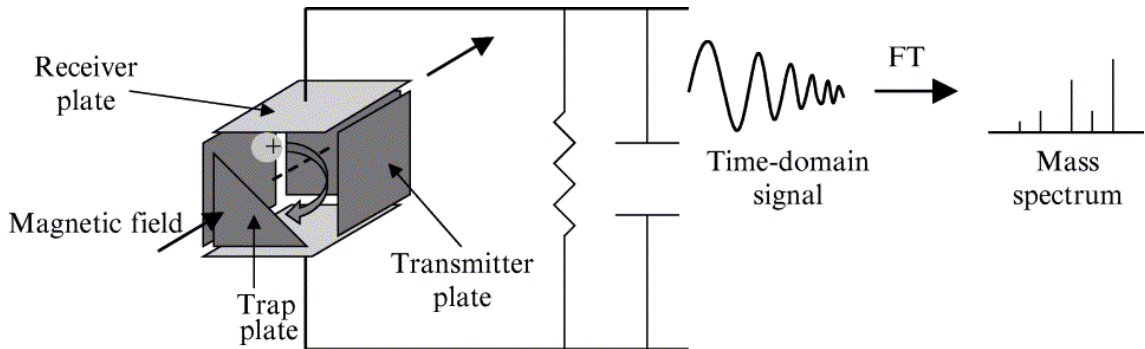
3D-ioniloukku koostuu rengaselektrodista, jota pidetään kahden päätykannen hyperbolisen elektrodin välissä, käyttämällä värähtelevän ja staattisen sähkökentän yhdistelmää sähköpotentiaalin tuottamiseksi. Tässä hiukkaset ovat loukussa kaikkiin kolmeen suuntaan, joten ne eivät pääse pakenemaan (kuva 7). Tämä instrumentti erottaa ionit ajallaan, koska kaikki ionit ovat analysaattorin sisällä, mutta vain tiettyjen ionien annetaan poistua päästäkseen ilmaisimeen). [19.]



Kuva 7. 3D-ioniloukun kaavakuva [20].

### 2.3.4 Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssianalysointilaite

Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssianalysointilaite (FT-ICR) koostuu laatikosta, joka on upotettu voimakkaaseen magneettikenttään (kuva 8) ja jonka sisällä ionit ovat loukussa. Ionit kiertävät kulkuradat kohtisuorassa magneettikenttään nähden. [21.]

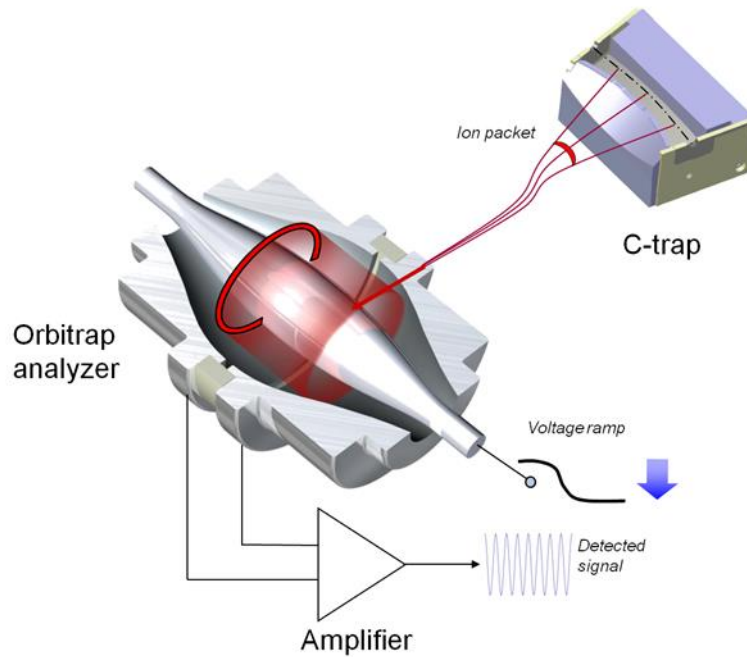


Kuva 8. FT-ICR:n toimintaperiaate [22].

Jos ionia säteilytetään samalla taajuudella olevalla sähkömagneettisella aallolla, resonanssiansorption ansiosta, se lisää energiansa aiheuttaen instrumentin havaitseman ionisäteen laajenemisen (ioni kulkee lähempänä ilmaisulevyjä). Käytettyä energiaa voidaan käyttää myös ionien poistamiseen ansasta kiihdyttämällä niitä loukun sädettä suurempaan syklotronisäteeseen tai ionien dissosiointiin. Fourier-muunnosta käyttämällä on mahdollista muuntaa instrumentin tallentamat monimutkaiset aallot  $m/z$ -spektriiksi [23].

### 2.3.5 Orbitrap

Orbitrap (FT-OT) eli ns. kiertoloukku on sähköstaattinen ioniloukku, joka käyttää Fourier-muunnosta massaspektrien saamiseksi. Sillä on kompakti rakenne suhteessa FT-ICR:iin, koska se toimii ilman magneettikenttää ja se koostuu kahdesta elektrodista: ulkoinen elektrodi on muotoiltu tynnyriksi, jonka sisällä on kiinteä elektrodi. [24;25.] Kuvassa 9 on esitetty, miten ionit kulkevat pyöreän tai soikean radan keskielektrodin ympäri.



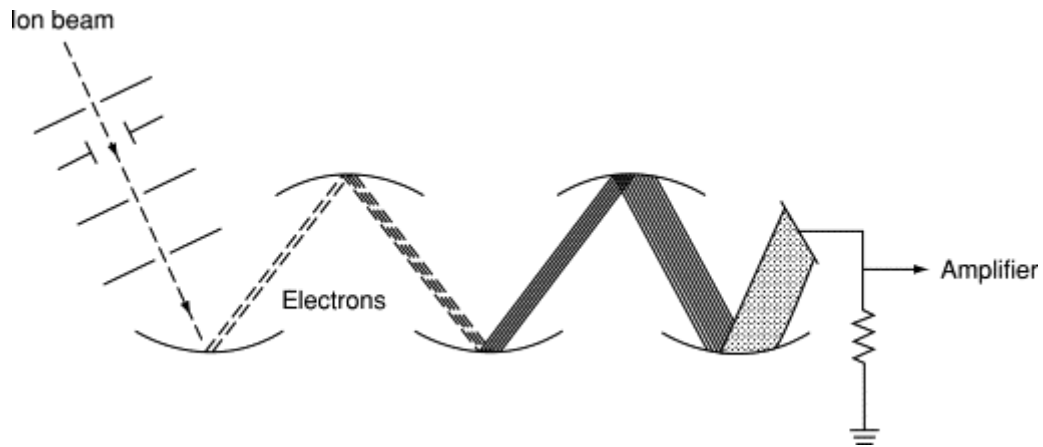
Kuva 9. FT-OT massa-analysaattori [25].

## 2.4 Detektori

Detektorille iskeytymisessä vapautuu energiaa, jolloin muodostuu sekundaarisia partikkeleja, kuten elektroneja. Detektorin tehtävä on havaita tämä muodostunut energia, muuttaa se sähköiseksi signaaliksi ja siirtää se tietokoneelle [26].

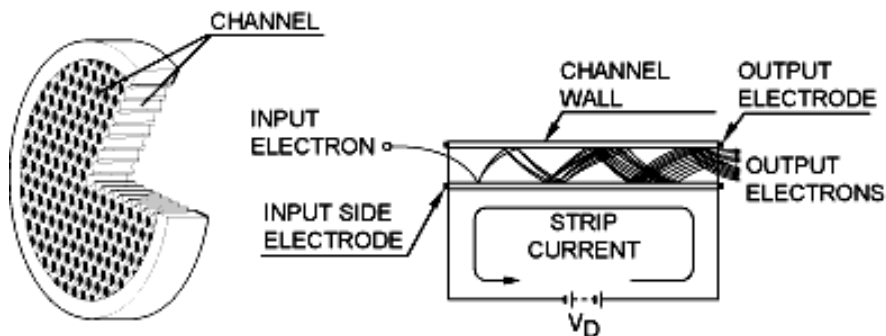
Elektronimonistin (EM) on yksi MS:ssä yleisimmin käytetyistä ioni-ilmaisimista. Analysaattorin ionit kiihdytetään suuriin nopeuksiin havaitsemistehokkuuden parantamiseksi sarjalla elektrodeja (dynodia), jotka pidetään korkeilla negatiivisilla potentiaaleilla asteittain korkeammilla jännitteillä. Ilmaisिन kertoo tulevat varaukset: ensimmäinen dynodi emittoi useita sekundaarisia hiukkasia (vastakkaisella varauksella verrattuna iskupartikkeliin) suoraan suhteessa pommittavien ionien määrään. [27.] Kuvassa 10 on esitetty, miten elektronin osuessa dynodiin siitä emittoituu useita uusia elektroneja, joten määrä moninkertaistuu jokaisella osumalla seuraaviin dynodeihin.





Kuva 10. Elektronimonistin (diskreetin dynodin kaavakuva). Ensimmäiseen dynodiin kohdistuu MS:n ionisäde- ja se vahvistaa sähkösignaalin muodostavia elektroneja, jotka osuvat muihin dynodeihin [28].

Mikrokanavien levytunnistimet (kuva 11) koostuvat levystä, jolla on kennorakenne ja jossa on yhdensuuntaiset kaarevat lieriömäiset kanavat, joiden halkaisija on  $10\ \mu\text{m}$  ja jotka on päällystetty puolijohtavalla materiaalilla. Jokainen mikrokanava on jatkuvan dynodisen elektronin kertoja. [29.]

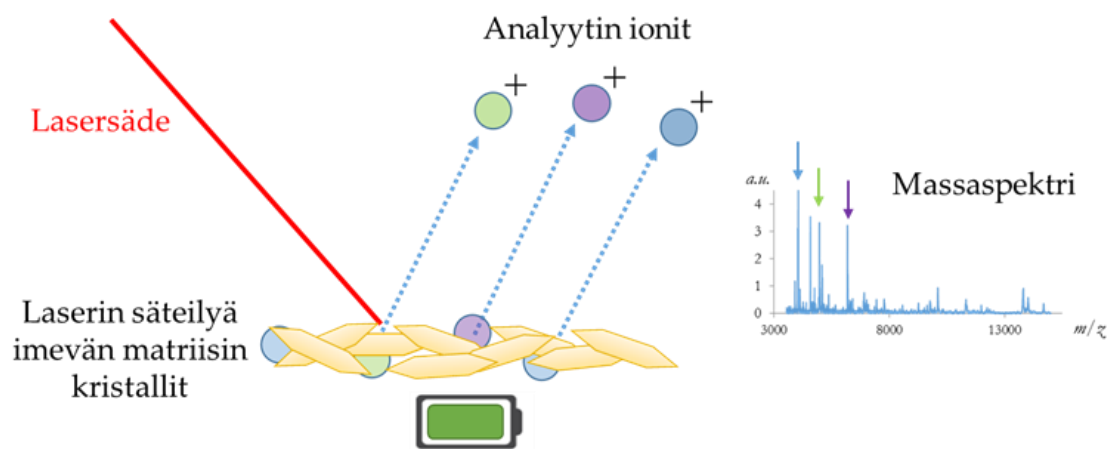


Kuva 11. Graafinen esitys mikrokanavalevyilmäisimestä. Oikealla kennomaisen levyn yhden kanavan läpileikkaus [30].

Koska sekundaarinen elektronireitti on hyvin lyhyt, tämä ilmaisim on erittäin herkkä ja sopii hyvin TOF-analysaattoreille. Yksi anodi kerää sekundaarielektroneja ilmaisimen lopussa mittaamalla viimeisen virran. Se on sijoitettu kohtisuoraan ionisuihkun kanssa nopeuden resoluution säilyttämiseksi.

### 3 Matriisiavusteinen laserdeserptio-ionisaati, MALDI

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization eli matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio) kykenee ionisoimaan laajasti erilaisia molekyyliä kuten proteiineja, peptidejä, oligonukleotideja ja polymeerejä. Laite hyödyntää niin sanottua pehmeää ionisaatiota eikä tuhoa näytettä, vaan sitä voidaan ionisaation jälkeen käyttää muissa analyyseissä. Tämän mahdollistaa myös nimessä mainittu matriisi, joka absorboidessaan laserenergiaa auttaa näytettä ionisoitumaan ja suojaa sitä. [31;32.] Kuvassa 12 on esitetty MALDI:n perusperiaate.



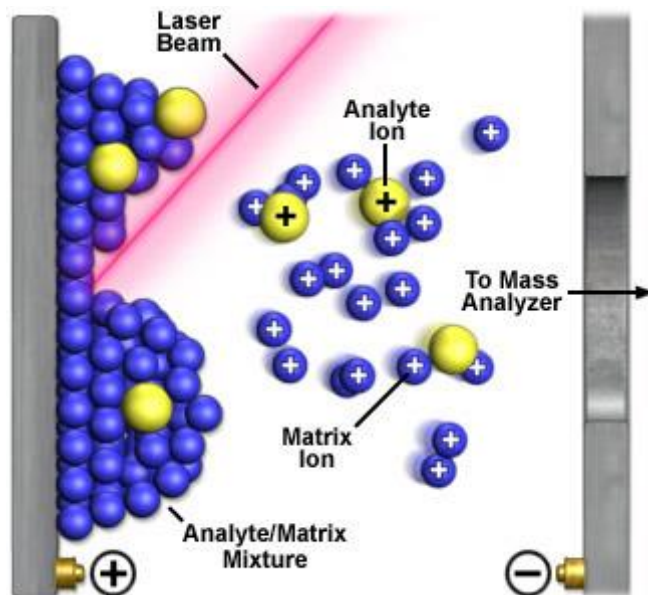
Kuva 12. Matriisiavusteisen laserdesorptioionisaation toimintaperiaate ja tuloksena saatava massaspektri.

#### 3.1 Matriisi

Matriisi on yhdiste kristallisoituvia molekyyliä, joka toimii MALDI-analyyseissä ikään kuin puskurina näytteen ja laserin välillä. Matriisin tehtävä on suojella näytettä, joka laserin voimasta tuhoutuisi kokonaan. Sen tehtävä on myös ionisoida varsinaista näytettä ja kantaa se lentotien läpi, jotta se voidaan havaita detektorilla. Matriiseja on useita erilaisia, ja niiden koostumus vaihtelee. Siksi onkin tärkeää valita matriisi tutkittavan biomolekyylin sekä käytettävän laserin mukaan, sillä optimaalisen matriisin valinta vaikuttaa ratkaisevasti tunnistustulokseen [33]. Matriisin pitää absorboida tehokkaasti laserin valoa niillä aallonpituuksilla, joita analyyseissä käytetään. Matriisiksi pitää valita myös kemiallisilta ominaisuuksiltaan sellainen aine, joka ei reagoi näytteen kanssa [29].

### 3.2 Ionisaattori

Matriisi- ja analyttikiteitä altistetaan laserille, joka aiheuttaa paikallisen lämpötilan nousun säteilytetyllä alueella. Tämä aiheuttaa analyttien ja matriisin desorptiota ja ionisoitumista, poistaen näytteen ulkokerrokset [32]. Poistettu materiaali sisältää sekä neutraaleja että varautuneita hiukkasia, jotka ovat vuorovaikutuksessa keskenään desorboituneessa tilassa, kuten kuvassa 13 on esitetty. Päinvastoin kuin tavanomainen laserionisaatio, analytti ei resonoi suoraan laserin kanssa: MALDI-matriisin käyttö mahdollistaa yhden ainoan aallonpituuden käytön ilman tarvetta säätää tätä parametria kullekin resonanssitaajuudelle.

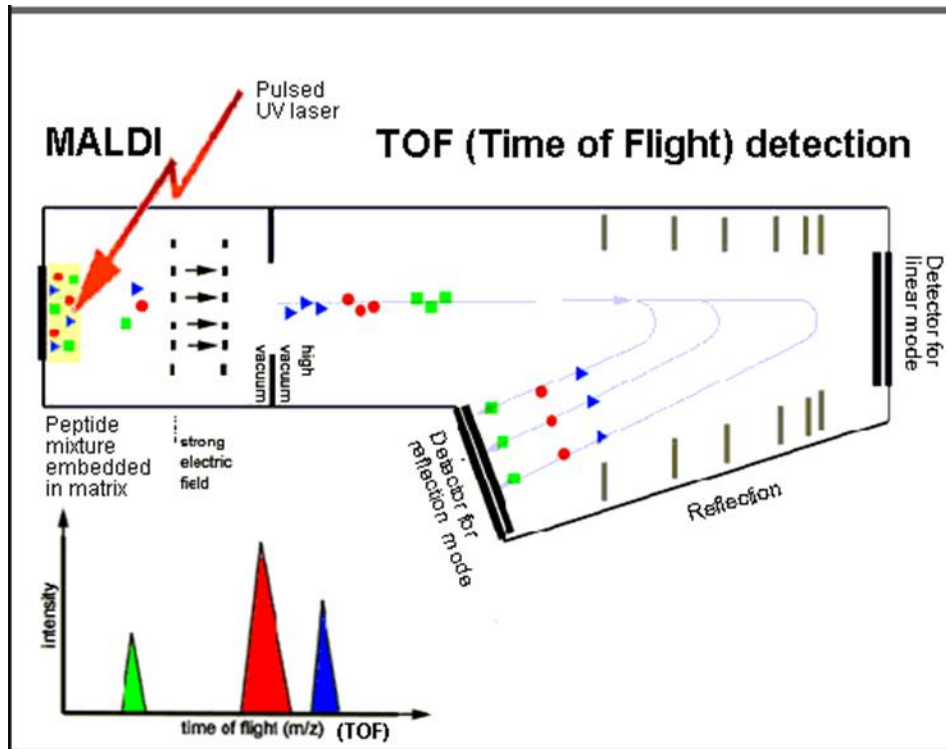


Kuva 13. matriisiavusteisen laserdesorptioionisaation periaate [35].

### 3.3 Lentoaikamassaspektrometria, TOF

Lentoaika (TOF) -analysaattorit erottavat ionit mittaamalla ajan, joka ioneilta kuluu niiden liikkuesssa kentättömän alueen läpi, lähteen ja ilmaisimen välillä. Ioneja muodostuu lähteessä, ja soveltamalla suurta kiihtyvyysspotentiaalia ne työnnetään korkean tyhjiön lentoputkeen (1-2 metriä), jonka lopussa ne saavuttavat ilmaisimen eri aikoina  $m/z$ :nsa mukaan. [36.]

Kuvassa 14 on esitetty heijastava eli hidastava sähkökenttä (sarja rengasmaisia elektrodeja lisääntyvällä potentiaalilla), joka sijaitsee kentättömän ajoalueen takana, ionilähteen vastaisesti.



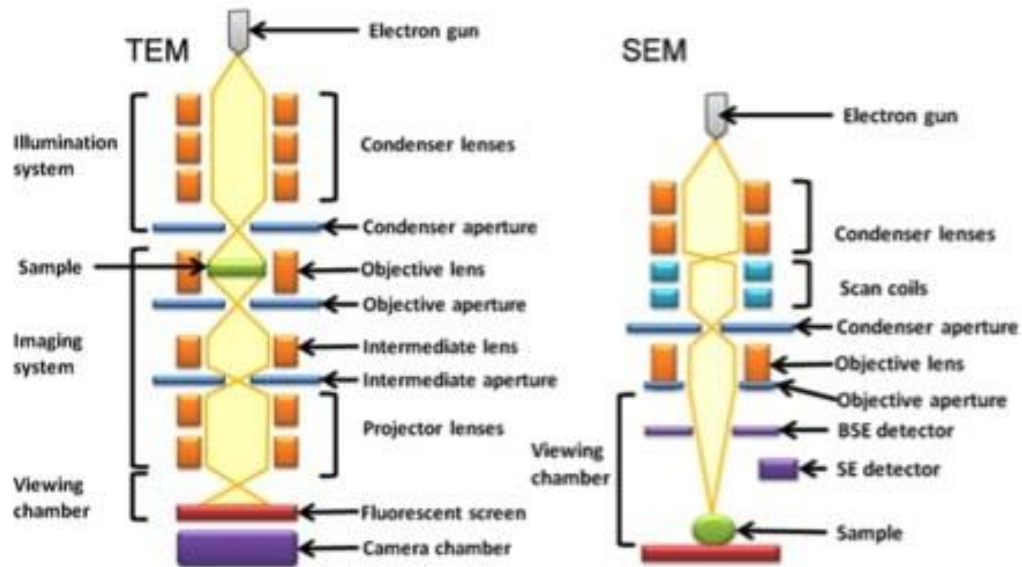
Kuva 14. Heijastustilassa ionit, joilla on samat  $m/z$ -suhteet, mutta eri nopeudet kulkevat heijastuskentässä eri syvyyksissä, korjaten niiden kineettisten energioiden erot [30].

Kaksi ionia, joilla on sama  $m/z$ -suhde, mutta hiukan erilaiset kineettiset energiat, havaitaan lineaarisessa tilassa erilaisina piikkeinä, vaikka ne olisivat samaa molekyyllilajia. Käyttämällä heijastinta nämä ionit tunkeutuvat sähkökenttään, kunnes ne saavuttavat nolla-kineettisen energian. Ioni, jolla on suurempi kineettinen energia, kulkee edelleen heijastimeen ennen hylkäämistä. Tämä lentotien ero korjaa niiden kineettisten energioiden erot, jolloin saadaan yksi huippu ja parannetaan tarkkuutta. [37.]

#### 4 Elektronimikroskopia

Elektronimikroskoopi on perusrakenteeltaan valomikroskoopin kaltainen linssijärjestelmä, joka on rakennettu mikroskooppipylvääseen. Se hyödyntää valon sijaan elektronisuihkua, jolla näytettä pommitetaan [38]. Elektronimikroskooppityyppejä

ovat muun muassa läpäisyelektronimikroskoopi (TEM, Transmission Electron Microscope), jolla päästään 100 KeV:iin, mutta vaatii ohuen näytteen sekä todella runsaasti näytteen esikäsittelyä ja pyyhkäisyelektronimikroskoopi (SEM, Scanning Electron Microscope), jonka resoluutio rajoittuu noin 25 Angstrongiin eli  $25 \times 10^{-10}$  m. [38;39.] Kuvassa 15 on esitetty näiden perustyyppien kaavakuvat.



Kuva 15. TEM eli läpäisyelektronimikroskoopin (vasemmalla) ja SEM eli pyyhkäisyelektronimikroskoopin (oikealla) kaavakuvat [40].

Läpäisyelektronimikroskoopissa tutkittavan näytteen kuva muodostuu fluoresoivalle levyllä, kun elektroneja ohjataan näytteen läpi magneettilinssien avulla. Pyyhkäisyelektronimikroskoopissa kuva muodostuu näytteen sisäisen rakenteen elektroneista, jotka irtoavat tai heijastuvat näytteen pinnasta, kun sitä pyyhitään edestakaisin kapealla elektronisuihkulla. Näin saadaan aikaan yksityiskohtainen pintakuva näytteestä.

## 5 Kemikaalit ja laitteistot

Tässä luvussa esitellään opinnäytetyössä käytetyt reagenssit, välineet ja laitteet.

## 5.1 Käytetyt reagenssit

Alla on listattu opinnäytetyössä käytetyt reagenssit. Kaikki MALDI:lla analysoimista varten käytetyt reagenssit olivat  $\geq 99\%$ .

- 2,5-dihydroksibentsoehappo (DHB), Lot# 1378087,  $C_7H_6O_4$ , Sigma Aldrich
- $\alpha$ -syaani-4-hydroksikanelihappo (CHCA),  $\geq 99\%$  TLC, CAS 28166-41-8,  $C_{10}H_7NO_3$
- sinappihappo (SA),  $\geq 99,0\%$  (T), CAS 530-59-6  $C_{11}H_{12}O_5$ , Fluka
- trifluorietikkahappo (TFA), 99,5%, Lot# A0365122,  $C_2HF_3O_2$ , Acros organics
- asetonitrili (ACN), Sigma Aldrich
- proteiinien kalibroitiliuos

## 5.2 Laitteet ja välineet

Työssä käytetyt laitteet ja niihin liittyvät välineet on listattu alla:

- Cryogenic Mixer Mill CryoMill, Retsch
- CM 3050 Cryostat, Leica Biosystems
- näytelevy, MTP 384 ground steel, 06632, Bruker
- ITO päällystetyt lasilevyt MALDI kuvannukseen, Bruker Daltonik GmbH, Part No. 8237001
- analyysivaaka, Gibertini E42-B
- Branson Sonikaattori 2510, Branson Ultrasonics

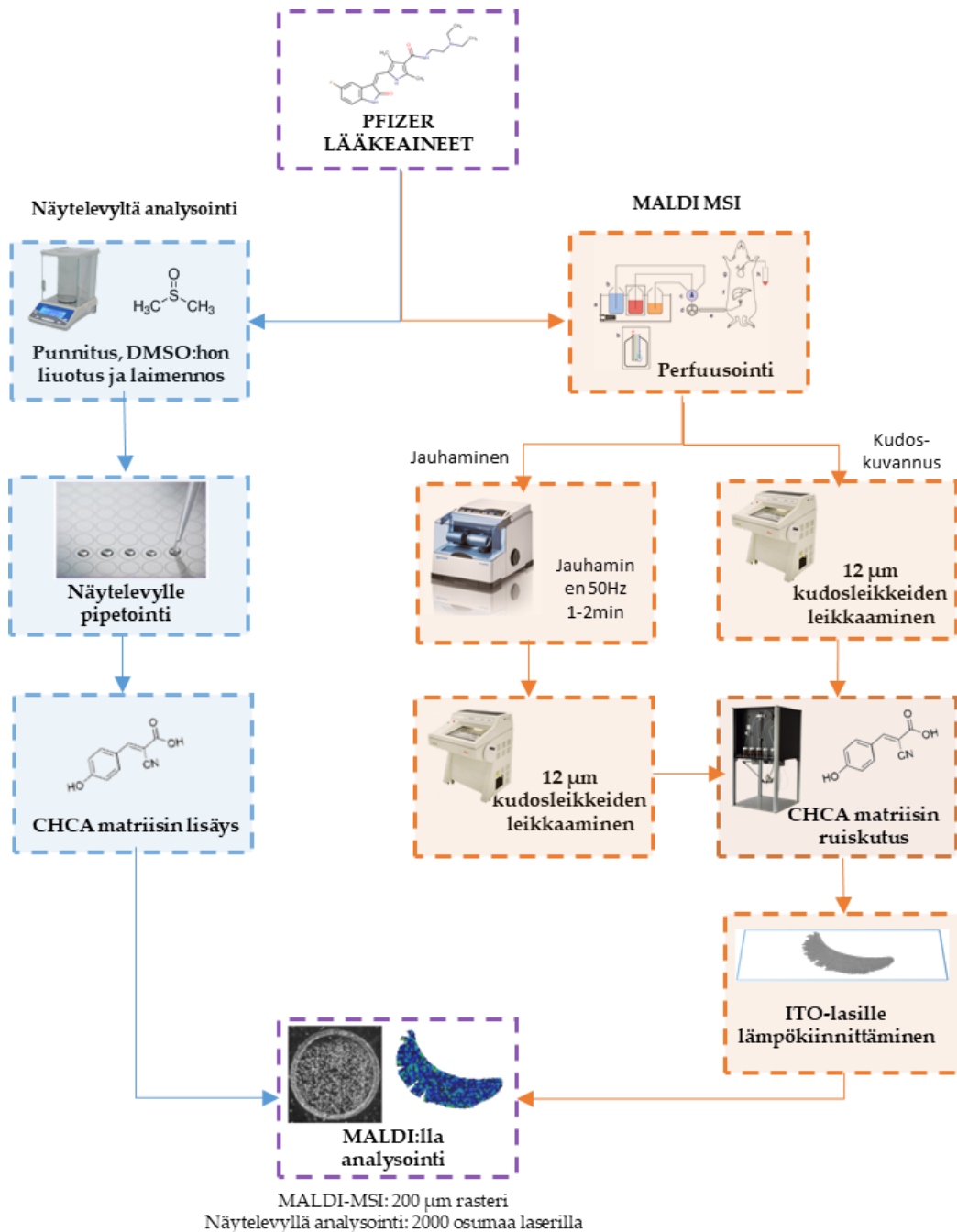
- Vortex, S.B.L. Apparacchi Scientifici
- HP Scanjet G4050 Photo Scanner, Hewlett Packard
- iMatrixSpray-laite, Tardo GmbH, Subingen
- MALDI, Bruker UltrafleXtreme 2 kHz MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer.

Taulukko 1. MALDI Bruker UltrafleXtreme 2 kHz MALDI-TOF/TOF Mass Spektrometerin mittauksissa käytetyt ominaisuudet

Laseri	Smart Beam 2; Nd:YAG laseri
Laserin frekvenssi	2000 Hz
Laserin energia	40-60%
Keräysmoodi	Positiivinen, reflektio
Laserin pulssi	2000 shots
Massa-alue	20-1000 Da
Ajo-ohjelma	Flex Control 3.4
Analysointiohjelma	Flex Analysis 3.4

### 5.3 Näytteenkäsittely ja mittausmenetelmät

Tässä opinnäytetyössä käytetyt menetelmät on esitetty yksinkertaistetusti kuvassa 16 ja niitä käsitellään tarkemmin myöhemmin tässä luvussa.



Kuva 16. Näytteenkäsittelyn etenemiskaavio perfusoiduille maksoille (oikealla oransseissa laatikoissa), jauhetuille maksanäytteille (kesellä oransseissa laatikoissa) ja suoraan näytelevylle pipetoiduille lääkeaineille (vasemmalla sinisissä laatikoissa).

Tavoitteena oli visualisoida valittujen syöpälääkkeiden jakautuminen kudoksiin kvantitatiivisella tavalla käyttämällä MALDI-kvantamista ja leimattomia massaspektrometrisiä lähestymistapoja spesifisessä rotan perfuusiomallissa. Lähtötilanteessa oli kahdeksan lääkeainetta, jotka on listattu taulukossa 2.



Taulukko 2. Opinnäytetyössä käytetyt lääkeaineet ja niiden moolimassat

Lääkeaine	Monoisotooppinen massa (u)
Axitinib	386,120
Bosutinib	530,165
Dacomitinib	469,168
Gedatolisib	615,328
Glasdegib	374,186
Mavelertinib	415,433
Palpociclib	477,238
Sunitinib	398,212

Taulukossa on ilmoitettu yhdisteen monoisotooppiset massat (monoisotopic mass), millä tarkoitetaan massaa, joka saadaan laskemalla yhteen kunkin alkuaineen runsaimman isotoopin teoreettinen massa. Termi on yleinen massaspektrometriassa, kun taas esim. liuskemiassa alkuaineiden massat lasketaan niiden suhteellisten moolimassojen mukaan. [41.]

### 5.3.1 Lääkeaineiden liuotus ja laimennos

Lääkeaineet liuotettiin dimetyylisulfoksiidiin (DMSO) niiden yleisesti huonon veteen liukenemisasteen vuoksi DrugBank suosituksen mukaisesti, pitoisuustasolla kantaliuoksissa 1-2 mM. Myöhemmin tiettyjen lääkeaineiden kohdalla kokeiltiin myös 50-prosenttiseen etanoliin ja pH 6,0 PBS-liuokseen liuottamista. Jotta saataisiin selville kunkin lääkeaineen todelliset spektrit pitoisuuksilla, joita voitaisiin mitata kudoksista, kirjastojen oletettujen sijaan, valmistettiin laimennokset 1:100 ja 1:1000 asetonitriiliin (ACN) pitoisuuksilla 0,02 mM ja 0,002 mM eli 20  $\mu$ M ja 2  $\mu$ M.

Kokeet aloitettiin edellä mainituilla pitoisuuksilla, käyttäen kolmea eri matriisia, jotta saataisiin selville lääkeaineiden ionisaation kannalta tehokkain. Matriisivaihtoehdot olivat sinapiinihappo (SA), alfa-syaani-4-hydroksisinnamiinihappo (CHCA) ja 2,5-dihydroksibentsoehappo (DHB), joiden ominaisuuksista ja käyttötarkoituksista on kerrottu lisää taulukossa 3. Matriisit otettiin pakastimesta huoneenlämpöön muutama minuutti ennen käyttöä ja punnittiin n. 28 mg kutakin matriisia omiin näytepulloihin

analyysivaakatarkkuudella. Oikean pitoisuuden saavuttamiseksi laskettiin koko tilavuudeksi 4 ml, josta 2 ml ACN:ä, 0,8 ml 1-prosenttista TFA:a ja 1,2 ml ultrapuhdasta vettä, edellä mainitussa järjestyksessä [42]. ACN:n lisäyksen jälkeen liuosta pidettiin ultra-äänihauteessa n. 20 sekuntia kerrallaan, kunnes kiinteä matriisi oli kokonaan liuennut. Parhaiten näytteiden ionisaatiota edistäväksi matriisiksi osoittautui alfa-syano-4-hydroksikaneelihappo.

Taulukko 3. MALDI:n eniten käytetyt matriisit, niiden absorptiomaksimit ja käyttökohteet.

Matriisi	Aallonpituus (nm)	Käytetyt applikaatiot
$\alpha$ -syaani-4-hydroksikanelihappo; CHCA tai HCCA	337, 353 nm (UV)	Peptidit, fragmentaatio
2,5-dihydroksibentsoehappo (DHB)	337, 353 nm (UV)	Proteiinit, peptidit, hiilihydraatit, synteettiset polymeerit
Sinapiinihappo, SA	337, 353 nm (UV)	Proteiinit, peptidit

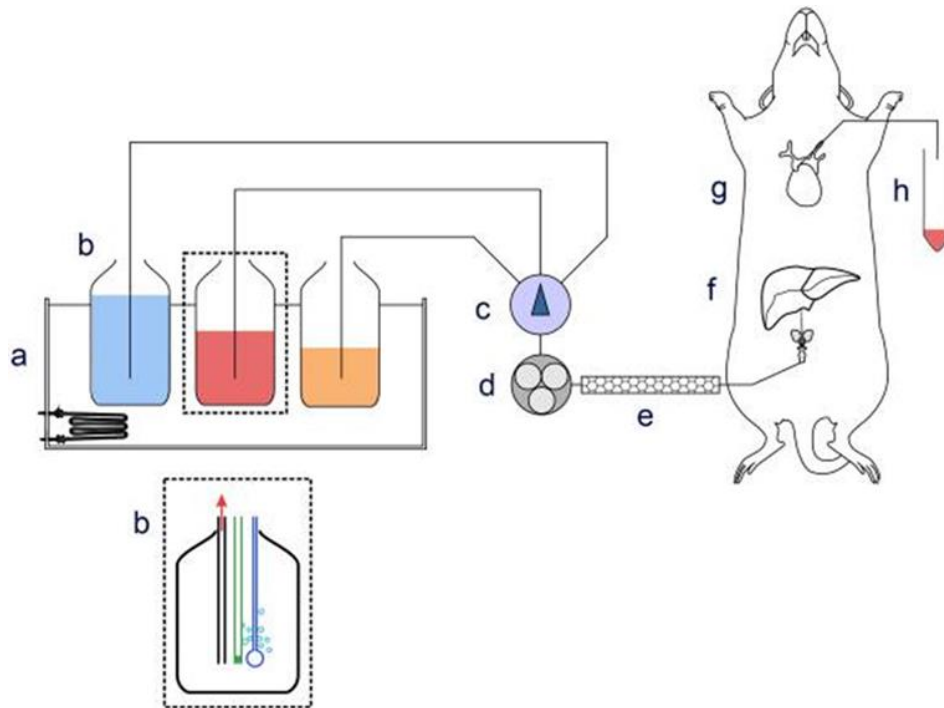
Analyysi suoritettiin Bruker UltrafleXtreme 2 kHz MALDI-TOF/TOF-massaspektrometrillä, positiivisella moodilla, ampuen 20–1000 Da:n massa-alueella summaten yhteensä 2000 kertaa laserilla. Tietyille lääkeaineille, jotka ionisoituivat huonosti, kokeiltiin myös negatiivista moodia. Kaikille näytteille suoritettiin LIFT MS/MS -ajo, fragmenttien selvittämiseksi.

### 5.3.2 Maksojen perfusointi

Opinnäytetyötä varten tarvittiin eläviä laboratoriorottia, joiden pitämisen oli hyväksynyt Helsingin yliopiston laboratorioeläinkeskus. Koe-eläiminä käytettiin Wistar uros rottia, jotka olivat peräisin Envigosta, Alankomaista ja painoivat 140–160 grammaa.

Eläimiä pidettiin paastossa 24 tuntia ennen kokeita ja nukutettiin 60 mg/kg natriumtiopentaalilla [43]. Rotan vatsa avattiin ja 100 IU/kg hepariinia injektoidiin alantolaskimoon. Kahden minuutin kuluttua 24 G -kanyyli työnnettiin portaalisuoneen ja maksa perfusoidiin perfuusioliuksella, joka oli valmistettu glukoosittomasta Hankin tasapainotetusta suolaliuksesta (HBSS),  $37 \pm 1$  °C:n lämpötilassa (kuva 17). Laskimot, jotka menevät maksaan, suljettiin suonon sidonnan avulla, ja nämä lohkot poistettiin, jättäen oikean ylälevyn koskemattomaksi. Virtaus oli 5 ml / (min x grammaa/ määrän maksan paino). 18 G -kanyyli työnnettiin laskimoon, sydämen oikean eteisen

läpi, jotta poistuva neste voitaisiin kerätä maksasta 1 minuutin fraktioissa glukoosimääritystä varten. Valmistelu kesti vähemmän kuin 10 minuuttia rotan vatsan avaamisesta. 5 minuutin stabilointijakson jälkeen suoritettiin perfuusio. Perfuusiokokeen jälkeen maksan oikea sivuseinäämä leikattiin pois ja jäädettiin nestemäisellä tyypellä.



Kuva 17. Kaavio perfuusiolaitteesta. a) lämpöhaude; b) pullot, jotka sisältävät perfuusio-liuokset tasapainotettuna O<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>:lla (19: 1) pH:ssa 7,40 ± 0,05; c) jakaja; d) peristalttinen pumpu; e) termostaatti lämpötilassa 37 ± 1 °C; f) kanyyli tulo-liuokselle; g) kanyyli poistuvan liuoksen keräämiseen; h) ja fraktiokeräin [44].

### 5.3.3 Jauhettujen kudoksenäytteiden valmistaminen

Jotta kudoksen (maksan) aiheuttamia häiriötekijöitä spektrissä voitaisiin tunnistaa ja ottaa huomioon, rotan maksoja jauhettiin nestetyppi (N<sub>2</sub>)-lämpötilassa (-196 °C) tunnetulla pitoisuudella analyytteja (1 µM - 100 µM). Tämä metodi hyödynsi Cryogenic Mixer Mill CryoMill-laitetta, joka ensin jäähdytti näytteen -80 °C:n -196 °C:seen käyttäen nestetyppiä (30 s–1,5 min) ja sitten jauhoi näytteen 50 Hz taajuudella (1–2 min) metallikuulalla metallisessa kammiossa. Kudoksesta ja sen ominaisuuksista riippuen jauhamiseen käytettiin 5–9 edellä mainittua sykliä. Kun näyte oli kokonaan jauhettu, se siirrettiin 0,5 ml:n eppendorf-putkiin, sulatettiin vähän ja sentrifugoitii mahdollisimman lyhyesti, jotta saataisiin näyte tiiviiksi kuin kudos ja jotta mahdolliset

ilmakuplat lähtisivät. Näyteputki upotettiin nestetyyppeen, jotta näyte kylmenisi välittömästi. Näytteinä käytettiin sekä perfusoituja että tavallisia rotan maksoja.

Lääkeaineiden lisäysajankohtaa vaihdeltiin, jotta saataisiin selville, vaikuttaako se jakautumiseen. Ensimmäisessä lähestymistavassa lääkeaine pipetoitiin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n maksapalan päälle, jonka jälkeen se jauhettiin edellä mainitun metodin mukaisesti. Toisessa lähestymistavassa maksan palaa jauhettiin ensin 4 sykliä metodin mukaisesti, siirrettiin nestetyyppihauteeseen, avattiin kammio, lisättiin lääkeaine, ja jatkettiin jauhamista vielä 5 sykliä. Lopuksi kokeiltiin myös jauhaa maksan palaa täydet 9 sykliä, siirrettiin jauhe Eppendorf-putkiin, sulatettiin, lisättiin lääkeaine, sekoitettiin spaattelilla, sentrifugoitiin ja jäädytettiin nestetyyppihauteessa.

#### 5.3.4 Kudosten leikkaaminen

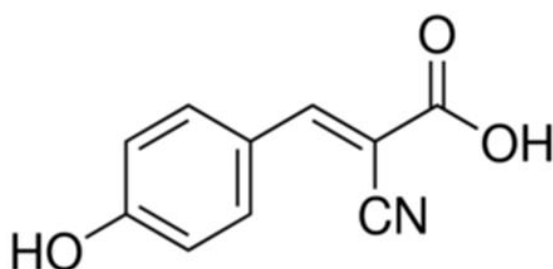
Maksan ja muiden elinten MALDI:lle aiheuttamien häiriötekijöiden selvittämiseksi kudოსleikkeiden leikkaaminen aloitettiin ilman lääkeaineita perfuusoiduista maksanäytteistä. Maksat otettiin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :sta leikkauslaitteeseen, joka oli asetettu n.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen eli lämpötilaan, jossa varsinainen leikkaaminen tapahtui, vähintään 30 minuuttia ennen leikkaamisen aloittamista. Kaikki leikkaamiseen tarvittavat välineet steriloidtiin 95-prosenttisellä etanolilla. Sopivaan lämpötilaan tasoittuneet näytteet kiinnitettiin näytepidikkeisiin ja leikattiin  $12\text{ }\mu\text{m}$  paksuja leikkeitä ja siirrettiin indiumtinaoksidi (ITO)-käsitellyille lasilevyille, joissa on konduktiivinen pinta.

Samaa metodia käytettiin myös jauhetuille kudოსnäytteille, jotka voitiin leikata joko suoraan jauhamisen jälkeen tai pakastuksen (säilytys  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) jälkeen. Eppendorf-putkiin siirrettyjä kudოსnäytteitä piti lämmittää hieman, jotta näyte saatiin irtoamaan putkea hajottamatta. Eppendorf-putkesta irrotettu, ympyräkartion muotoinen, jauhettu kudოსnäyte kiinnitettiin leikkausalustaan pohja ylöspäin ja leikattiin  $12\text{ }\mu\text{m}$ :n paksuisia leikkeitä. Näytteitä pyrittiin leikkaamaan kudoksen eri osista, sillä silmämääräisesti massa ei näyttänyt homogeeniselta. Leikkeet siirrettiin ITO-laseille, kiinnitettiin lämmittämällä kudosta lasin alapuolelta, kunnes kudος vaihtoi väriä painuen lasiin kiinni ja siirrettiin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen tai kuivajäiden avulla jatkoanalyysiin.

### 5.3.5 Näytteen valmistelu MALDI-kuvantamiseen

ITO-laseille kiinnitetyt näytteet tuotiin kuivajäiden avulla työtiloihin, kiinnitettiin MALDI-kuvantamiseen erityisesti tarkoitettuun näytelevyyn ja laitettiin vakuumiin kuivumaan. Kun näyte oli varmasti kuivunut, siitä voitiin ottaa kuvat skannerilla resoluutiolla 2400 pikseliä/tuumaa. Tästä saatu kuva siirrettiin MALDI:in kytkettyyn tietokoneeseen.

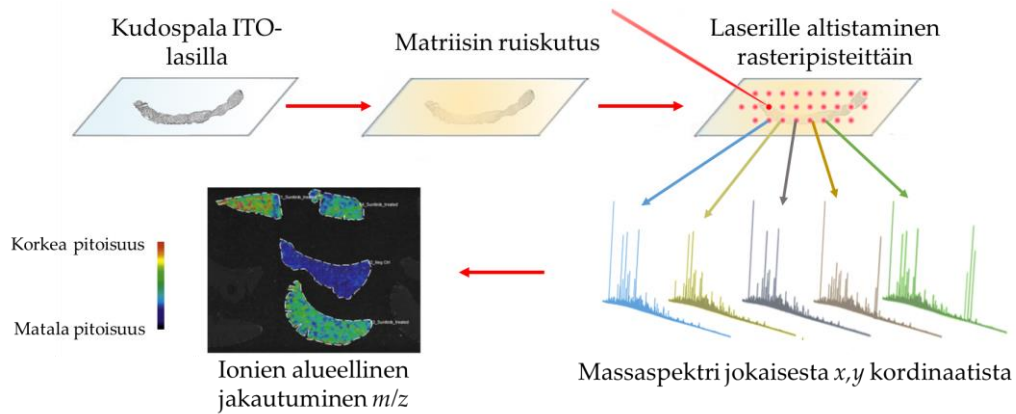
Matriisi valmistettiin samalla suhteella ja metodilla kuin aikaisemmin on selostettu. CHCA-matriisi, jonka kemiallinen kaava on esitetty kuvassa 18, on yksi yleisimmistä käytetyistä matriiseista peptideille ja pienille proteiineille [45], kemiallinen kaava. Hiukkasten poiston ultra-äänihauteessa jälkeen matriisia sisältävä pullo kytkettiin iMatrixSpray-laitteeseen. Näytelasi laitettiin ajokammioon ja siitä peitettiin maalarinteipillä ne osat, joiden ei toivottu joutuvan matriisin alle, kuten esimetriksi alareunaan kirjoitetut tiedot ja ylä- ja ala-reunaan piirretyt merkinnät kohdentamista varten. Laitteen robotti sumutti matriisia vaaka- ja pystysuuntaisina liikkeinä useita tasaisia kerroksia. Tätä kokeiltiin ensin puhtaalle optiselle lasille, jotta voitiin tarkkailla jäljen tasaisuutta.



Kuva 18. CHCA:n kemiallinen kaava [46].

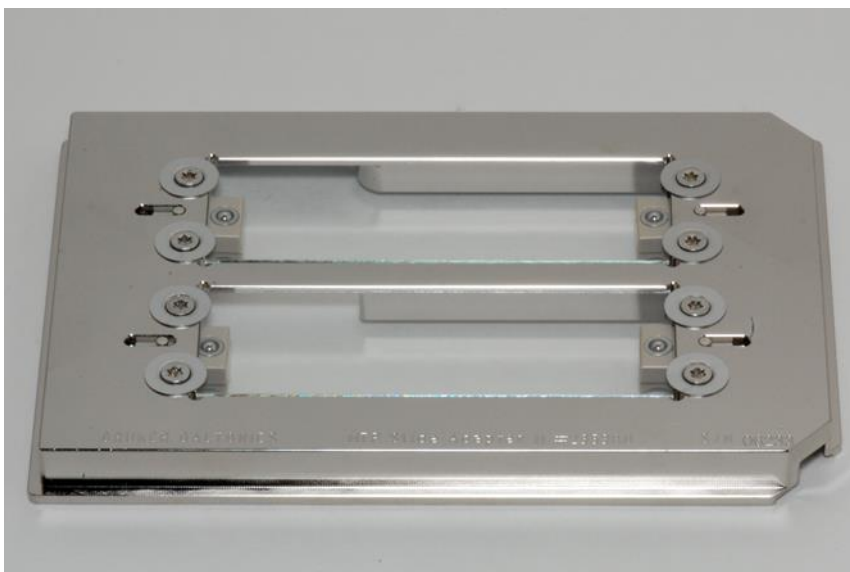
### 5.3.6 MALDI-kuvantaminen

Massaspektrometrinen kuvantaminen (MSI) on suhteellisen uusi tekniikka, joka mahdollistaa aluespesifiset molekyyli mittaukset biologisista näytteistä [47]. Tämän analyysin lopputulos on molekyylikuva minkä tahansa spektrin ionin jakautumisesta kudoksessa. Periaate on esitetty kuvassa 19: laseri analysoi koko näytteen hankkimalla massaspekttrin jokaiselle yksittäiselle pisteelle (ts. x-, y-koordinaatit), mikä mahdollistaa tietyn ionin jakauman visualisoinnin lämpökartan kautta.



Kuva 19. Massaspektrometrinen kuvantamisen periaate esitetty työvaiheittain.

Massaspektrometriset analyysit suoritettiin Brukerin UltraflexExtreme MALDI-TOF/TOF-laitteella, jossa käytettiin flexControl-ohjelmistoa v3.4. Kun ennen matriisin ruiskutusta skannattu näytelevy (esitetty kuvassa 20) oli asetettu laitteen sisään, mittausalueet rajattiin FlexImaging 3.0-ohjelmiston avulla ja yhdistettiin itse kuvannusohjelmaan. Kun nämä ”opetuspisteet” oli lisätty molempiin ohjelmiin, voitiin olla varmoja, että kuvantamisessa laseri ampui oikeisiin, tunnettuihin pisteisiin. Tämä oli tärkeää, jotta tiedettiin tarkasti, missä kudosta loppuu ja tausta alkaa, ja voitiin näin valita analysoitavaksi vain kudosta sisältävät alueet, sekä voitiin minimoida mahdollisten väärin positiivisten tulosten mahdollisuus. Lisäksi kuvannus, kudoksen koosta ja rasterista riippuen, saattoi kestää useamman tunnin, joten toimimalla edellä selostetulla tavalla säästettiin paljon aikaa.



Kuva 20. Näytelevy kahdelle ITO-päällystetylle lasilevyllä MALDI-kuvantamiseen [48].

Laite kalibroitiin joka kerta ennen ajon aloittamista seoksella, oikeilla massa-alueilla ionisoituvia yhdisteitä, sekä lääkeaineilla, joita oli tarkoitus visualisoida myös itse näytteestä. Kalibroitiliuosta oli pipetoitu 0,8 µl:n pisaroita samalle levyllä näytteiden kanssa useampaan kohtaan. Tarkemmat mittaussparametrit, kuten laserin teho, voitiin säätää ennen ajoa mittaamalla eri alueita kudoksista ja arvioimalla saatujen spektrien laatua. Useimmiten kuitenkin käytettiin projektin alussa kehitettyä, yleisesti toimivaksi havaittua metodia, jossa laserin teho oli 60 prosenttia maksimitehosta.

Näytteet analysoitiin lineaarisella positiivisella moodilla massa alueella 20–1000 Da 200 µm:n rasterilla. Rasteri on piste tietyssä koordinaatissa. Mitä enemmän näitä mittauspisteitä on, eli mitä pienempi rasterin arvo on, sitä parempi resoluutio on.

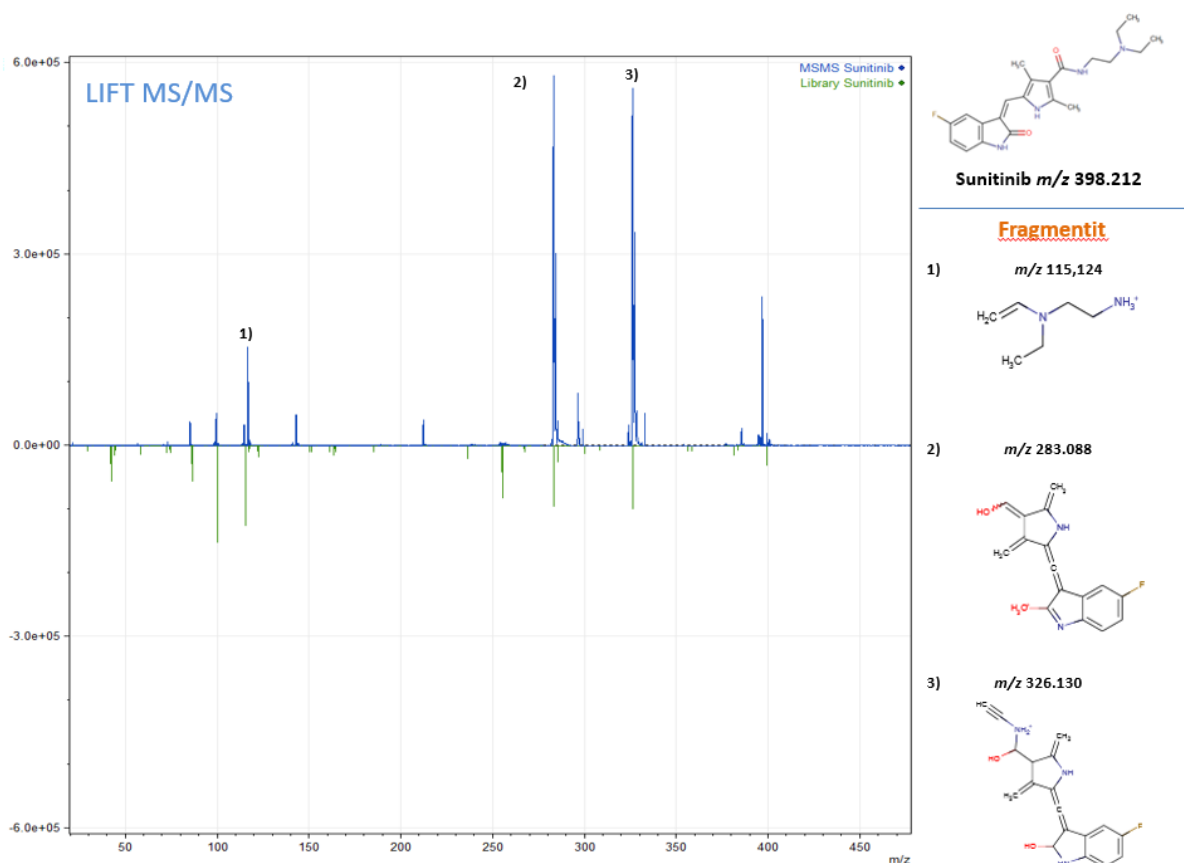
### 5.3.7 Näytteen valmistelu elektronimikroskoopille

Elektronimikroskopiaa varten pakastettuun kudokseen lisättiin 2-prosenttista glutaraldehydiä (EM-laatu) ja jauhettiin nestemäisen tynen lämpötilassa. Saatu kudosjauhe sulatettiin ja saatettiin huoneenlämpötilaan, jossa sitä pidettiin 2 tuntia. Kiinnitetty kudosjauhe huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä viisi kertaa ja käsiteltiin siirtoelektronimikroskopiaa varten standardimenetelmien mukaisesti. Lyhyesti, kudos dehydratoitiin ja upotettiin epoksihartsiin, minkä jälkeen ohuet leikkeet (80 nm) leikattiin käyttämällä ultramikrotomia. Ohutleikkeet värjättiin uranyyliasetaatilla ja lyijysitraatilla ja kuvattiin Jeol 1200 -läpäisevällä elektronimikroskoopilla. Kuvat hankittiin suurennuksella 500, 1000 ja 2000 kertaa.

## 6 Tulokset

Alun perin lääkeaineita oli kahdeksan. Ensimmäisissä analyyseissa, joissa verrattiin matriiseja, todettiin, että kolme näistä lääkeaineista ionisoitui selkeästi parhaiten ja muodosti selkeät spektrit. Alla on esitetty näiden lääkeaineiden antamat spektrit verrattuna tietokannasta saatuun spektriin. Liitteestä 1 löytyy kuvat, joissa esitetään ensimmäisen analyysin matriisien vertailua.

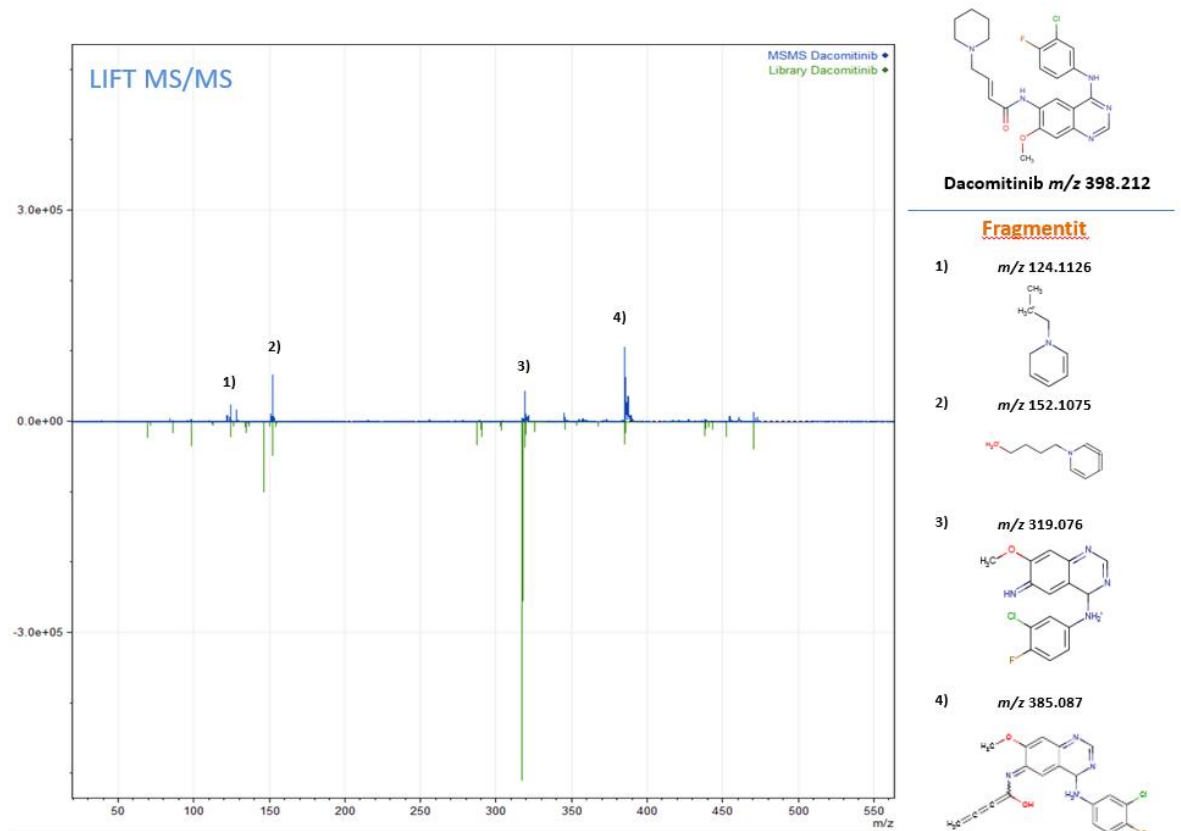
Ensimmäisenä on esitetty Sunitinib (kuva 21), joka vaikutti ionisoituvan parhaiten ja josta löytyi eniten kirjallisuutta ennestään. Näytelevyltä saatu spektri on ylhäällä ja selkeyden vuoksi tietokannasta (DrugBank) saatujen arvojen avulla tehty spektri ylösalaisin [49]. Tietokannasta saadun  $m/z$ -listan arvot on mukautettu vastaamaan MALDI:lta saatuja arvoja (arvot on kerrottu 10 000:lla, jotta ne vastaisivat intensiteetiltään laitteelta saatuja ja jotta niitä olisi helpompi vertailla) ja siirretty spektrien käsittelyohjelmaan.



Kuva 21. Sunitinibin MALDI:lla LIFT MS/MS -moodilla mitatun (ylhäällä) ja tietokannasta saadun (alhaalla), odotetun MS/MS -spektrin vertailu ja tarkastelun kohteena olleet fragmentit;  $m/z$  115,124; 283,088; 326,130 sekä ylimpänä Sunitinibin kemiallinen kaava.

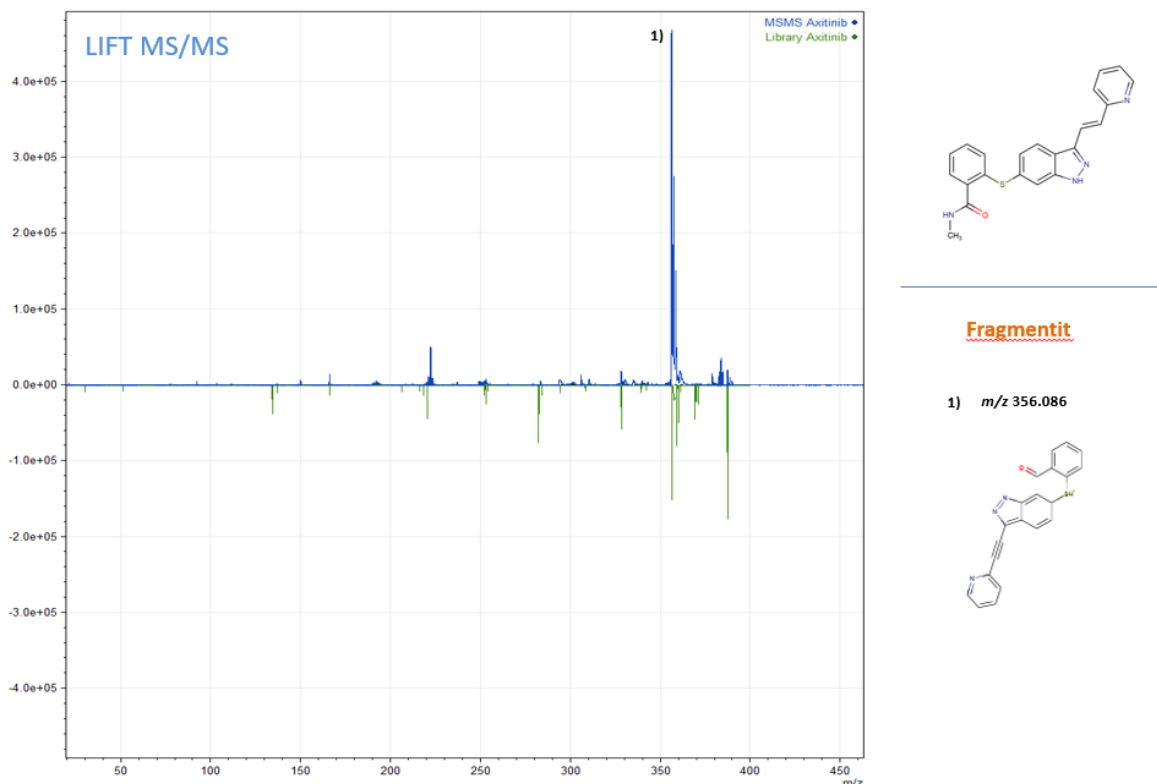
Jokaisesta lääkeaineesta on tarkasteltu tiettyjä piikkejä, joihin osattiin kiinnittää huomiota uusimpien tieteellisten julkaisujen ansiosta.





Kuva 22. Dacomitinibin neljä tarkasteltua fragmenttia;  $m/z$  124,1126; 152,1075; 319,076; 385,087 LIFT MS/MS -moodilla sekä yllä Dacomitinibin kemiallinen kaava.

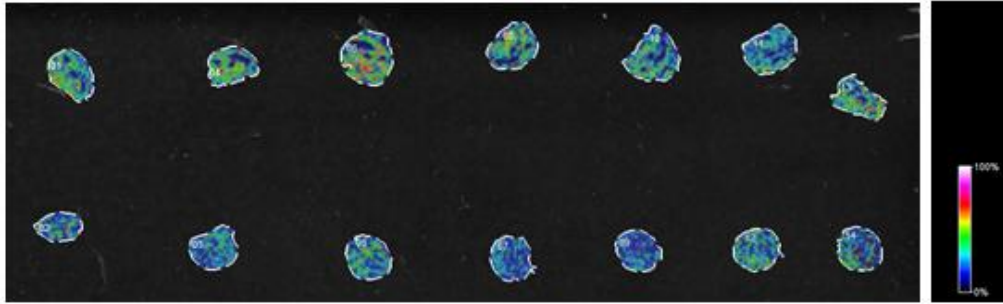
Tuloksia (Dacomitinib, esitetty kuvassa 22) on verrattu DrugBankistä saatuihin odotettuihin spektreihin, joten piikkien intensiteetti ja jopa sijainti ovat hieman erilaiset. Todellisia tuloksia vastaavista analyyseistä näillä lääkeaineilla ei tietokannoista löytynyt.



Kuva 23. Axitinibin spektri. Oikealla on sen kemiallinen kaava ja ainut fragmentti:  $m/z$  356,086 LIFT MS/MS -moodilla sekä Axitinibin kemiallinen kaava.

Axitinibin (esitetty kuvassa 23) todettiin myöhemmin, kudoksenäytteitä analysoitaessa, näkyvän hyvin kuvannuksessa. Jostain syystä saatu tulos ja odotettu spektri tälle lääkeaineelle ovat todella erilaiset. Tästä lääkeaineesta löytyi vähiten tieteellisiä julkaisuja.

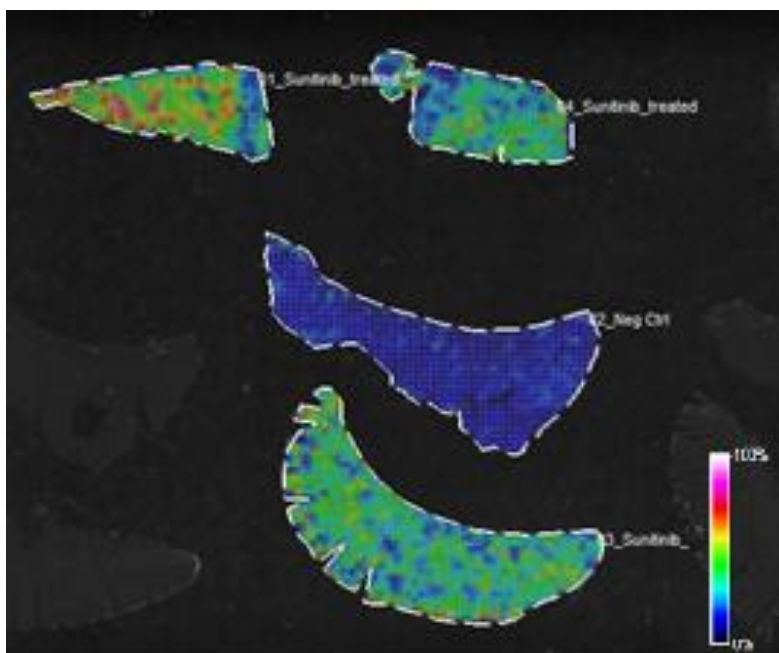
Ensimmäiset MALDI-kuvannukset suoritettiin jauhetuille kudoksenäytteille, joissa Sunitinibin pitoisuus oli 100  $\mu\text{M}$ , minkä oletettiin näkyvän varmasti. Negatiivikontrolliin lisättiin DMSO:ta samassa suhteessa kuin itse näytteissä tulisi olemaan, jotta saataisiin selville sen mahdollisesti aiheuttama tausta. Ensimmäisen MSI-analyysin tulos on esitetty kuvassa 24. Kaikissa tuloksien kuvissa on esitetty lämpöasteikko, joka osoittaa värin kunkin prosentuaalisen pitoisuuden mukaan kudoksessa. Analysoituja kudoksia ympäröivä valkoinen katkoviiva osoittaa mitatun alueen rajan, joka on manuaalisesti asetettu ennen kuvannuksen aloittamista.



Kuva 24. 100  $\mu\text{M}$ :n Sunitinib jauhetulla kudoksenäytteellä (ylärivi) ja negatiivikontrolli, jossa pelkkä DMSO (alarivi). Prosentuaalisen pitoisuuden mitta-asteikko on väreillä havainnollistettuna oikealla.

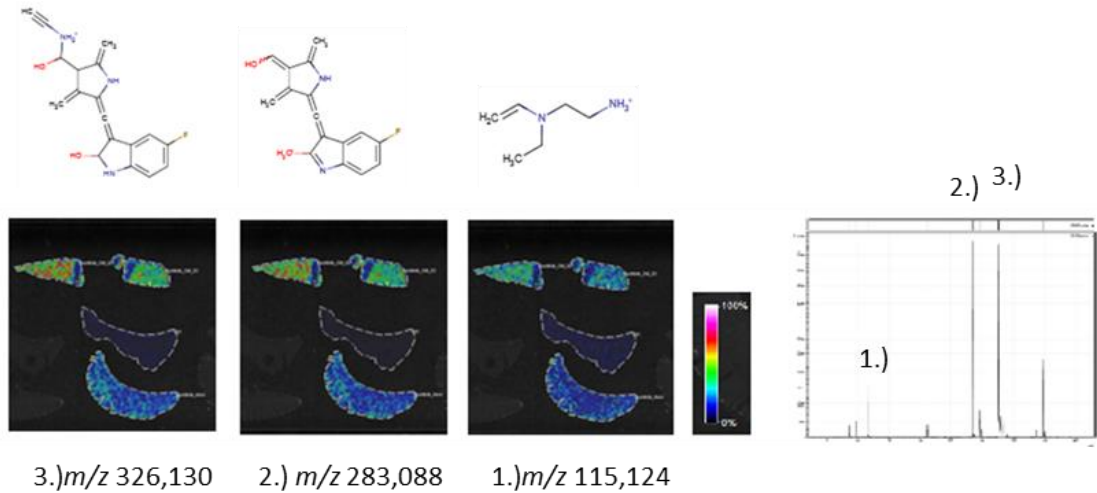
Tulos oli yllättävän huono näin korkealla pitoisuudella ja sai epäilemään lähestymistavan toimivuutta, sillä lääkeaineen pitoisuudet koe-eläinten maksoissa olisivat 2  $\mu\text{M}$ :n luokkaa. Tämän näytelasin kudokset analysoitiin myös MS/MS-moodilla, sekä Dacomitinibin ja Axitinibin suhteen, mutta pitoisuuksien ero näytteellä ja negatiivisella kontrollilla olivat yhtä pienet.

Koska jauhamalla valmistetuista kudoksenäytteistä saatiin epämääräisiä tuloksia, alettiin epäillä laitteen toimintaa näillä lääkeaineilla. Päätettiin kokeilla leikkaamalla sellaisten rottien maksoja, jotka olivat saaneet lääkeainetta ennen perfuusointia. Kuvassa 25 on esitetty tämän analyysin tulos. Ylärivissä esitetyt ”vanhat” maksat oli pakastettu 10.6.2015 ja ”uudet” 22.6.2015. Kummassakin näytemaksassa pitoisuus oli 2,5  $\mu\text{M}$ . Negatiivikontrolli oli myös pakastettu 22.6.2015.



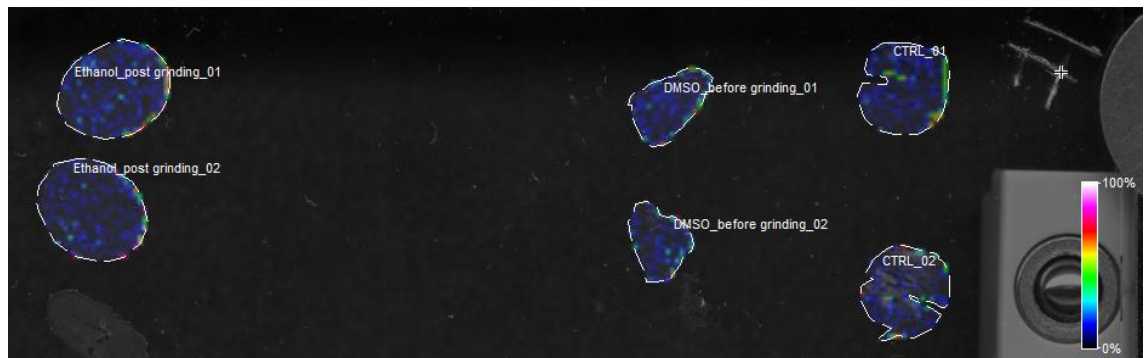
Kuva 25. Tunnetun Sunitinib-pitoisuuden määrittäminen perfuusoiduista maksoista,  $m/z$  398,212. Prosentuaalisen pitoisuuden mitta-asteikko on väreillä havainnollistettuna oikealla.

Jotta voitiin varmistua hyvästä tuloksesta, analysoitiin myös fragmentit MS/MS - moodilla. Kuvassa 26 on esitetty kolme Sunitinibin fragmenttia, joiden on esiinnyttävä näytteessä, jotta voitaisiin luotettavasti todeta näytteen sisältävän Sunitinibia.



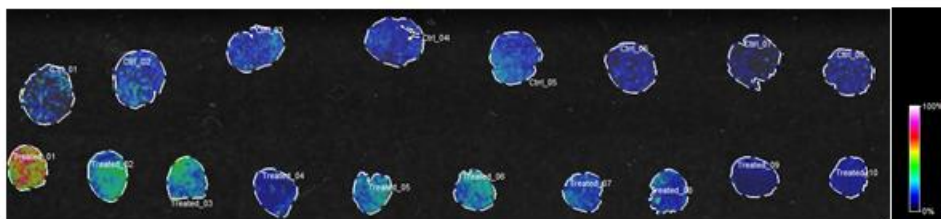
Kuva 26. Sunitinibin tarkastellut fragmentit ja niiden jakautuminen kudoksilla. Oikealla massaspektri, johon on numeroitu kyseiset fragmentit.

Kaikki odotetut fragmentit näkyivät MS/MS-ajon tuloksissa luotettavasti. Näin voitiin siis todeta, että laite toimi ja pystyi havaitsemaan halutun lääkeaineen. Näin ollen piti syy epäloogisiin tuloksiin löytyä muualta. Tutkittiin lisää tieteellisiä julkaisuja erityisesti Sunitinibista ja huomattiin, että joissain analyysissä tutkittavat lääkeaineet oli liuotettu etanoliin. Valmistettiin samalla menetelmällä kuin aiemmin, mutta DMSO:n sijasta etanolilla 50 $\mu$ M kudoksenäytteitä. Kuvassa 27 on esitetty tämän analyysin tulokset.



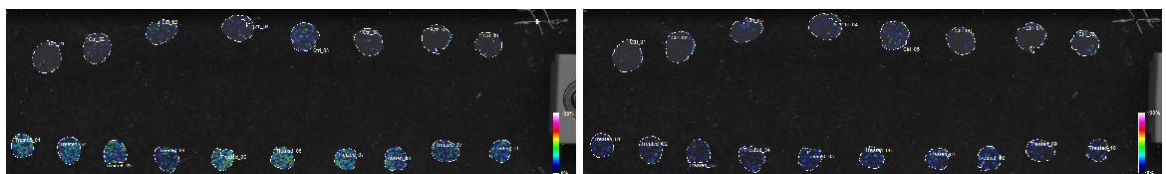
Kuva 27. Etanolin ja DMSO:n sopivuuden vertailu Sunitinibin laimentamiseen. Vasemmalla etanoli, keskellä DMSO ja oikealla negatiivikontrolli. Sunitinibin pitoisuus näytteissä 50  $\mu\text{M}$ ,  $m/z$  398,212.

Tällä analyysi ei näyttänyt edes vahvistavan, että DMSO sopisi Sunitinibin laimentamiseen paremmin, niin kuin useammat tietokannat olivat ilmoittaneet. Päätettiin siis vain toistaa analyyseja ja leikata mahdollisimman paljon leikkeitä yhdestä jauhetusta kudoksesta, sillä epäiltiin, että lääkeaine saattaisi painua pohjaan tai reunoihin sentrifugoinnin yhteydessä, tai mahdollisesti jostain syystä tulla pintaan. Päätettiin lisätä Sunitinibin lisäksi Dacomitinib, jotta saataisiin mahdollisimman paljon hyötyä yhdestä analyysistä. Kuvassa 28 on tämän analyysin tulos.



Kuva 28. Ylärivissä negatiivikontrolli ja alarivissä 50  $\mu\text{M}$  Sunitinib  $m/z$  398,212.

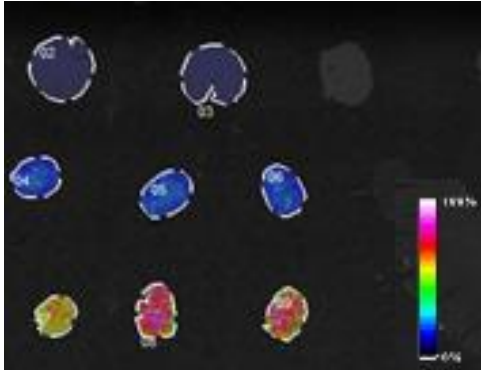
Kuvassa 28 esitetty tulos näytti aluksi lupaavalta, sillä vasemmalla olevassa leikkeessä, joka on leikattu mahdollisimman ”pohjasta”, näytti olevan huomattavasti enemmän lääkeainetta. Seuraava kuva (kuva 29) kuitenkin osoittaa sen, mitä MS/MS-analyyseissä selvisi: fragmenttien osuus ei noudata samaa logiikkaa kuin MS-analyyseissä saatu.



Kuva 29. MS/MS-analyysi kudoksetä Sunitinib  $m/z$  283,088 (vasemmalla) ja Dacomitinib  $m/z$  319,076 (oikealla).

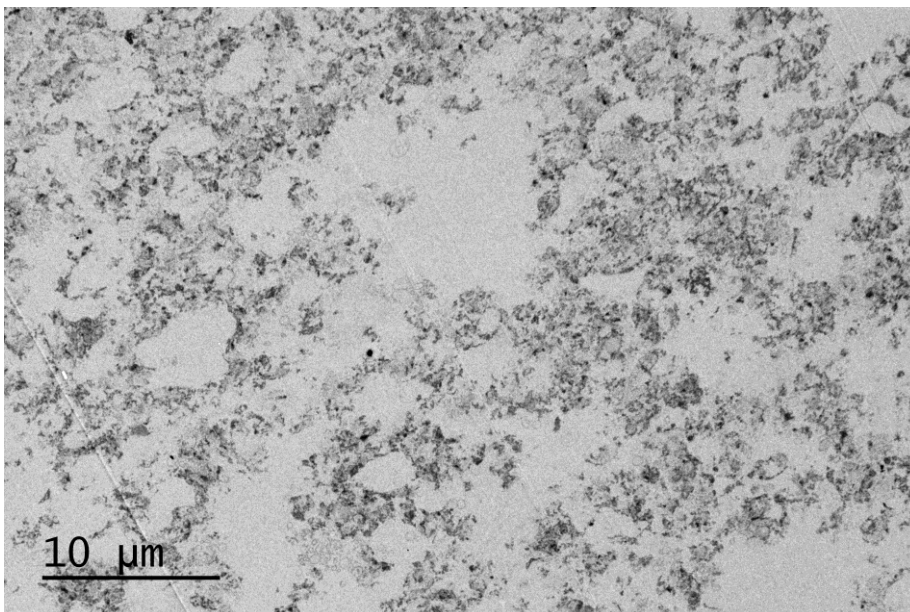
Kuvassa 29 on esitetty kummankin lääkeaineen yhden fragmentin MS/MS-analyysin tulos selkeyden vuoksi, mutta muiden fragmenttien antamat tulokset olivat yhtä huonoja. Tehtiin vielä lisää toistoja näillä kahdella lääkeaineella, tällä kertaa yksinään kudoksissa, mutta jopa 50  $\mu\text{M}$ :n pitoisuudella lääkeaineet näkyivät yhtä huonosti kuin ennenkin. Tämä aiheutti hämmennystä, joten päätettiin kokeilla analyyseja Metforminilla,

joka oli todettu hyvin ionisoituvaksi toisessa tutkimuksessa. Valmistettiin 50  $\mu\text{M}$ :set kudoksenäytteet samalla periaatteella kuin aiemminkin, yksi laimennettuna DMSO:hon toinen veteen. Analyysin tulos on esitetty kuvassa 30.



Kuva 30. Metformin veteen liuotettuna (keskellä), Metformin DMSO:hon liuotettuna (alhaalla) ja kontrolli (ylimpänä). Molemmat näytteet ovat 50  $\mu\text{M}$   $m/z$  130,16.

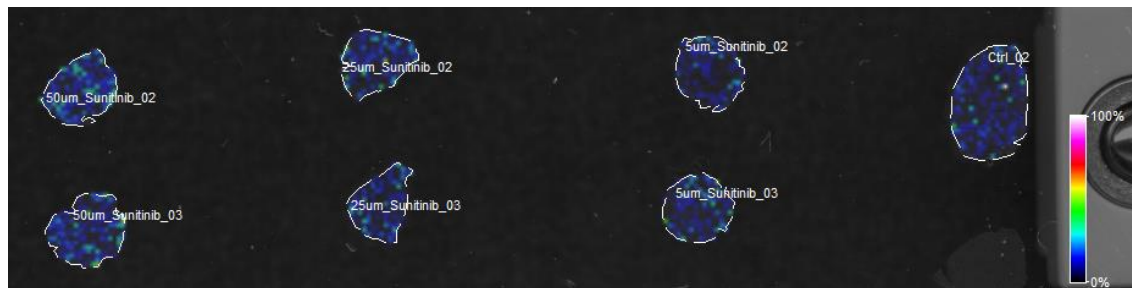
Analyysissa todettiin jälleen, että laite toimi hyvin ja toisaalta, että ainakin Metformin näkyi selkeästi myös jauhamalla valmistetuissa kudoksenäytteissä. Päätettiin tarkistaa jauhettujen kudoksenäytteiden koostumus pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM), Viikissä.



Kuva 31. Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla otettu kuva Sunitinibin kanssa jauhetusta maksanäytteestä. Mittakaava on esitetty vasemmalla (10  $\mu\text{m}$ ).

Tulos paljasti, että kudoksen luontainen rakenne oli hajotettu kokonaan jauhamalla, ilman minkäänlaisia todisteita suuremmista fragmenteista, jolloin saatiin amorfinen kudoshomogenaatti, jonka hiukkaskoko oli arviolta alle muutama mikrometri.

Valmistettiin vielä 5, 25 ja 50  $\mu\text{M}$ :set kudoksenäytteet, sekä Sunitinibista että Dacomitinibista, sillä aikaisemmista tuloksista ei ollut saatu minkään laista suoraa. Näillä kolmella pitoisuudella, samalla levyllä, tehdystä MS/MS-analyysistä saatu tulos on esitetty kuvassa 32.



Kuva 32. Sunitinib jauhetuilla kudoksenäytteillä kolmessa pitoisuudessa. Samaa pitoisuutta olevat näytteet ovat pystyriveissä, korkeimmasta pitoisuudesta laimeampaan vasemmalta oikealle (50, 25 ja 5  $\mu\text{M}$ ),  $m/z$  326,130. Oikealla suurin leike negatiivinen kontrolli.

Tämäkään tulos ei selventänyt tilannetta yhtään enempää, sillä näytteiden pitoisuuksissa ei näyttäisi olevan mitään eroa. Lisäksi negatiivinen kontrolli ei näytä sisältävän vähemmän tällä massa-alueella esiintyviä fragmentteja. Kaiken kaikkiaan pitoisuudet ovat todella pieniä ja voidaan olettaa signaalien olevan taustaa.

## 7 Tulosten tulkinta

Epäselvien tulosten vuoksi epäiltiin, että lääkeaine saattaisi painua pohjalle tai seinille näytteen valmisteluvaiheessa, sentrifugoitaessa. Jos asia olisi näin, lääkeaine olisi mahdollisesti leikattu pois kudostenleikkeiden trimmauksen aikana, sillä Eppendorf-putkesta irrotettu, ympyräkartion muotoinen, jauhettu kudoksenäyte kiinnitettiin leikkausalueen pohja ylöspäin.

Toisaalta DMSO tai maksa saattaa aiheuttaa sellaista taustaa, joka ilmenee juuri fragmenttien kohdalla. Tätä ei kuitenkaan pystytty toteamaan ja pyrittiinkin poistamaan

tämä vaihtoehto jo hyvin varhaisessa vaiheessa, lisäämällä negatiivisiin kontrolleihin DMSO:ta.

Epäselvät tulokset voisivat johtua tuntemattomista reaktioista, joita tapahtuu jauhetussa kudoksessa. Koska Metformin toimi niin hyvin, tarkasteltiin opinnäytetyössä käytettyjen lääkeaineiden ja sen eroa. Selvin ero massaspektrometrian kannalta voisi olla suuri ero monoisotooppisissa massoissa (Metforminilla  $m/z$  130,16 ja esim. Sunitinibilla  $m/z$  398,212).

Suurin yllätys oli se, ettei lääkeaineen pitoisuus näytteissä näyttänyt muuttavan mitään. Selkein kuva lääkkeiden jakautumisesta kudoksella saatiin kokonaisista maksoista, joihin oli ennen perfusointia lisätty lääkeaine ja joiden pitoisuus oli 2,5  $\mu\text{M}$ , kun jauhettaessa näytteiden pitoisuus oli jopa 100  $\mu\text{M}$ .

Epäiltiin myös, tarttuisiko näyte jauhamisprosessissa ajokammion seinämiin tai vuotaisiko kammio. Tämän voisi koettaa selvittää esim. värjäämällä. Näin saattaisi selvitä, tapahtuuko kudoksessa jotain, kuten katoaako jokin aine kokonaan (hajoaako) tai reagoivatko jotkin aineet keskenään. Värjäykseen pitäisi valita jokin stabiili väriaine, jotta voitaisiin olla varmoja, ettei näytteen värjäytymättömyys johdu itse väriaineesta.



## Lähteet

1. Harris, D.H. 2002: Quantitative chemical analysis. 6. painos. W.H. Freeman and company, New York.
2. Leena Turpeenoja, Kalle lehtinen. Ihmisen ja elinympäristön kemia. 16.5.2018. Luku 3.4. Helsinki.
3. Jaarinen, S. & Niiranen J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy, s.123-124.
4. Malcolm Dole, L. L. M. et al. 1968. Molecular Beams of Macro ions. J Chem. Phys. 49. s. 2240–2249
5. Yamashita, M. & Fenn, J. B. 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. J Phys. Chem. 88, s. 4451–4459.
6. J.C.Vickerman. 1.1.2003 SIMS, Time-of-flight, and Surface Analysis Author links open overlay panel.
7. Shibdas Banerjee, Shyamalava Mazumdar. 2012. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. International Journal of Analytical Chemistry.
8. [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-electrospray-ionization-ESI-process-High-voltage-is\\_fig4\\_275518433](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-electrospray-ionization-ESI-process-High-voltage-is_fig4_275518433)
9. J.C.Vickerman. SIMS. 1.1.2003 Time-of-flight, and Surface Analysis Author links open overlay panel.
10. <https://www.cameca.com/products/sims/technique>
11. Zhixin Miao, Hao Chen, 2008. Direct Analysis of Liquid Samples by Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (DESI-MS).
12. [https://www.researchgate.net/figure/Desorption-electrospray-ionization-DESI-schematic\\_fig1\\_236737006](https://www.researchgate.net/figure/Desorption-electrospray-ionization-DESI-schematic_fig1_236737006)
13. Jaarinen, S. & Niiranen J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy, s. 125-126.

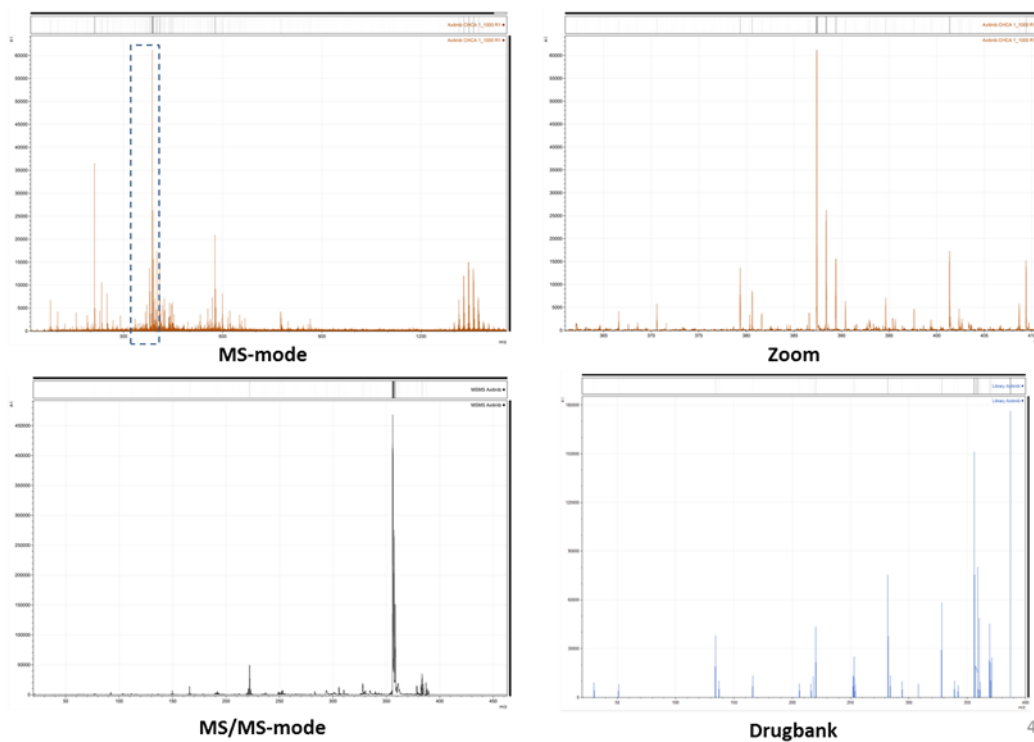
14. Bryan M. Ham, Aihui MaHam, 2016. Analytical Chemistry: A Chemist and Laboratory Technician's Toolkit, s. 506.
15. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128008713000079>
16. Jennifer N.Gushue. 2013. Comprehensive Analytical Chemistry, painos 61, s. 255-270.
17. Jae C Schwartz, Michael W Senko, John E. P Syka. 2002. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, painos 13, s. 659-669.
18. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044030502003847>
19. M.Barila, J.F.J.Todd. 1983. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics s. 67-70.
20. [https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/PS\\_2B2\\_Seq\\_MS.html](https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/PS_2B2_Seq_MS.html)
21. Manoj Ghate, Robert Mistrik, Vladimir Shulaev. 2016. Applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) and Orbitrap Based High Resolution Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics.
22. <http://www.mslab.ulg.ac.be/equipment/fticr-ms-bruker-apex-qe-9-4t/>
23. R.E. Jabbour, A.P. Snyder. 2014. Mass spectrometry-based proteomics techniques for biological identification, in Biological Identification.
24. John Wiley & Sons 2007. De Hoffmann, E & Stroobant, V: Mass Spectrometry Principles and Applications, 3. painos.
25. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:OrbitrapMA%26Injector.png>
26. Brinkmalm, A. M., Ekman, R. & Silberring, J. 2009. Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, s. 65.
27. F.A.Mellon. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, toinen painos, 2003, s. 3739-3749.
28. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/electron-multiplier>
29. T.Gys. 2015. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, s. 254-260.

30. [http://www.dmp Photonics.com/MCP\\_MCPImageIntensifiers/microchannel\\_plates.htm](http://www.dmp Photonics.com/MCP_MCPImageIntensifiers/microchannel_plates.htm)
31. Applied maths, a biomerieux company. <<https://www.applied-maths.com/features/analyzing-maldi-tof-spectra>>. Luettu 2.7.2019
32. Creative proteomics, MALDI-TOF Mass Spectrometry. <<https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>>. Luettu 2.7.2019
33. Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. 2011. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS microbiology reviews 36, s. 380-407.
34. Clark, A., Kaleta, E., Arora, A., Wolk, D. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift on the routine practice of clinical microbiology. Clinical microbiology reviews, Vol. 26, No. 3, s. 547–603.
35. <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/maldi>
36. Radboud University, General instrumentation. <<https://www.ru.nl/science/gi/facilities-activities/other-devices/maldi-tof/>>. Luettu 12.7.2019
37. Applied maths, a biomerieux company. <<https://www.applied-maths.com/applications/maldi-tof-bacterial-identification>>. Luettu 12.7.2019
38. nanoScience instruments, Scanning electron microscopy. <<https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>>. Luettu 1.8.2019
39. Swapp Susan. 26.5.2017. Scanning Electron Microscopy (SEM). University of Wyoming.
40. <https://bitesizebio.com/29197/introduction-electron-microscopy-biologists/>
41. Antti Mikkonen. Isotooppisuus. 2. Massaspektrometrian peruskäsitteitä, Luettu 5.6.2019
42. , Bruker Guide to MALDI Sample Preparation, s.6. <[https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/Separations\\_MassSpectrometry/InstructionForUse/8702557\\_IFU\\_Bruker\\_Guide\\_MALDI\\_Sample\\_Preparation\\_Revision\\_E.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/InstructionForUse/8702557_IFU_Bruker_Guide_MALDI_Sample_Preparation_Revision_E.pdf)>. Luettu 24.3.2019
43. Eriksson, O., Pollesello, P., and Geimonen, E. 1999. Regulation of total mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in perfused liver is independent of the permeability transition pore. Am. J. Physiol. 276, C1297–C1302. Luettu 15.5.2019

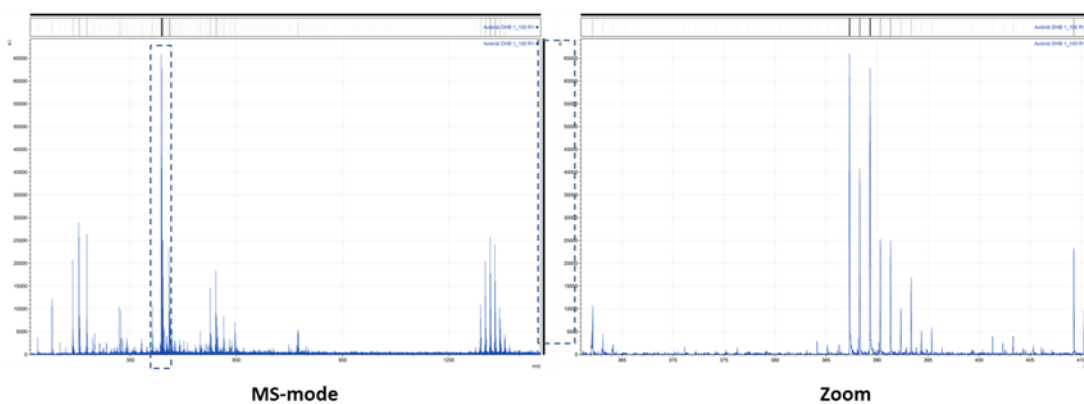
44. Giulio Calza. Lactate-Induced Glucose Output Is Unchanged by Metformin at a Therapeutic Concentration – A Mass Spectrometry Imaging Study of the Perfused Rat Liver.
45. Spectroscopy. 1.2.2010. CHCA or DHB? Systematic Comparison of the Two Most Commonly Used Matrices for Peptide Mass Fingerprint Analysis with MALDI MS.
46. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/70990?lang=fi&region=FI>
47. SandraSchulz. 2019. MALDI mass spectrometry imaging in pharmaceutical research and drug development, s. 51-59
48. [https://en.wikipedia.org/wiki/File:MALDI\\_imaging\\_target.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:MALDI_imaging_target.jpg)
49. [https://www.drugbank.ca/spectra/ms\\_ms/64015](https://www.drugbank.ca/spectra/ms_ms/64015).

## Matriisien vertailuanalyysi

Axitinib,  $m/z$  386,12, CHCA

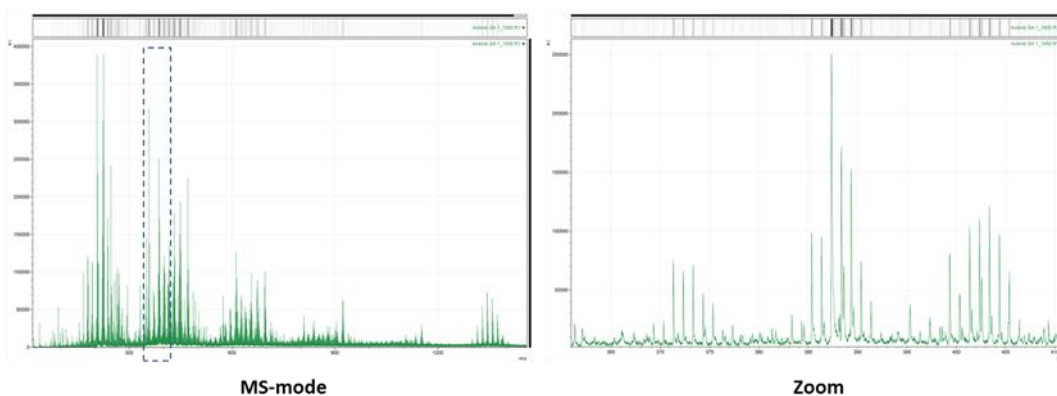


Axitinib,  $m/z$  386,12, DHB





**Axitinib, m/z 386,12, SA**



Yllä on esitetty MALDI:iin sopivalla teräksisellä näytelevyllä suoritettujen matriisien vertailuanalyysin tuloksia. Parhaiten opinnäytetyössä käytettyjä lääkkeitä auttoi ionisoitumaan CHCA. Kuvissa on esitetty ehkä selvimmin eron esille tuova Axitinib.