

Mgr Piotr Sosnowski

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

Pracownia Peptydów

Autoreferat rozprawy doktorskiej

***„Obrazowanie tkanek metodą spektrometrii mas MALDI-MSI”***

Promotor: prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Klasyczne przygotowanie próbki do badania, polegające na ekstrakcji substancji badanej z materiału biologicznego, zazwyczaj jest długotrwałym i skomplikowanym procesem. Obecnie dąży się do uproszczenia tych procedur, zmniejszając tym samym ingerencję w strukturę i skład próbki. Metodą która odnosi coraz większe sukcesy na świecie i staje się dopełnieniem, a nawet alternatywą dla klasycznych technik, jest obrazowanie za pomocą spektrometrii mas (MSI - *Mass Spectrometry Imaging*). W metodzie tej źródło jonów oddziałuje na powierzchnię odpowiednio przygotowanego skrawka tkanki, co powoduje desorbcję cząsteczek z tkanki z jednoczesnym zapisem informacji co do dystrybucji sygnału. Dane te są następnie przekształcane do postaci dwuwymiarowej mapy intensywności sygnału na powierzchni analizowanej próbki, zazwyczaj stosując kolorystyczny gradient pozwalający na określenie poziomu intensywności sygnału w danym miejscu.

Główną zaletą MSI jest możliwość analizy szerokiego spektrum molekuł bezpośrednio z fragmentu tkanki z jednoczesnym zachowaniem ich selektywności, w szczególności przy zastosowaniu czułych i wysokorozdzielczych analizatorów mas. Pozwala to na porównanie chociażby ekspresji białek i peptydów u osobników zdrowych oraz obarczonych chorobą. Dodatkowo, analizowane molekuły nie podlegają konieczności znakowania radioizotopowego czy derywatyzacji chemicznej.

Celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie warunków obrazowania endogennych peptydów w tkankach zwierzęcych metodą spektrometrii mas MALDI-MSI.

Pierwszym etapem moich badań była optymalizacja metodyki nakładania matrycy na tkankę, poprzez porównanie różnych metod aplikacji matrycy oraz porównanie krystalizacji poszczególnych matryc, w zależności od stosowanych rozpuszczalników oraz stężeń rozpuszczanej matrycy. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczyłem odpowiednie parametry dotyczące rozpuszczalników w roztworach matrycy oraz nadruku jej za pomocą drukarki chemicznej CHIP-1000. W kolejnym etapie, na podstawie danych literaturowych oraz wstępnych eksperymentów, wyznaczyłem metodykę płukania tkanek przed pomiarem. Najlepsze efekty uzyskałem przy zastosowaniu 70% i 95% roztworów etanolu oraz chloroformu. Opracowane parametry nakładania matrycy wykorzystałem w celu zobrazowania dystrybucji peptydów w skrawkach szczurzego mózgu. Na tym etapie sprawdziłem także krystalizację matrycy na tkance oraz określiłem warunki pomiaru do wykonywania eksperymentu obrazowania. Wykonałem także obrazowanie skrawków pochodzących ze szczurzego serca, aby uzyskać ogólny profil molekuł w tej tkance. Część z otrzymanych sygnałów charakteryzowała się indywidualną dystrybucją, a otrzymane dane mogą być w przyszłości wykorzystane przy porównaniu profilów molekuł u osobników zdrowych oraz w modelu choroby (np. nadciśnienie) w celu wyznaczenia markerów chorobowych.

W trakcie prowadzenie badań zauważyłem, że wykonywanie obrazowania metodą spektrometrii mas MALDI-MSI na małych tkankach jest często kłopotliwe nie tylko ze względu na ograniczoną rozdzielczość optyczną spektrometru mas, ale także z powodu problemów z manipulacją i przygotowaniem odpowiednich skrawków. Dlatego w moich badaniach dotyczących analizy neuropeptydów w przysadce szczura, zastosowałem jako medium osłonowe kurze żółtko. Przeprowadzone badania, pokazały iż metoda ta może być wykorzystywana do szczegółowej charakteryzacji molekuł obecnych w organie, zarówno ich dystrybucji na powierzchni skrawka jak i identyfikacji. Żółtko nie powoduje efektu delokalizacji cząsteczek, a obecne w samym żółtku naturalne lipidy nie interferują z będącymi obiektem zainteresowania peptydami w przysadce. Metodę z wykorzystaniem kurzego żółtka zastosowałem do identyfikacji neuropeptydów. Peptydy o masie >2000 Da zidentyfikowałem poprzez fragmentację przeprowadzoną bezpośrednio na tkance. Moje badania wskazały, że sekwencja szczurzej  $\beta$ -endorfiny otrzymana podczas fragmentacji

przeprowadzonej bezpośrednio na tkance (alanina w pozycji 26) różni się sekwencji dostępnej w bazach danych i sprzedawanej jako standard analityczny (walina w pozycji 26).

Wyniki uzyskane w toku moich badań zostały częściowo opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.