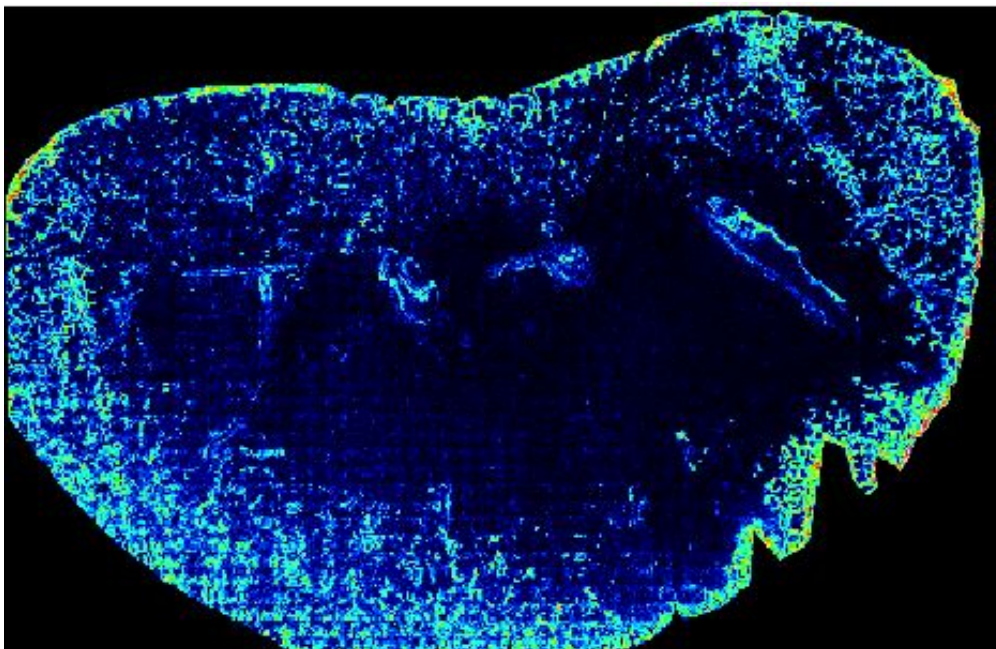




CHALMERS



Grafen för att förbättra kemisk avbildning av biologisk vävnad

En studie med masspektrometri

Kandidatarbete 2017: KBTX10-17-02

Alexander Back
Philip Bjellheim
Julia Darvelid
Elin Henriksson
Victoria Karlsson
Tove Widén

Kemi och kemiteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2017

KANDIDATARBETE 2017: KBTX10-17-02

Grafen för att förbättra kemisk avbildning av biologisk vävnad

En studie med masspektrometri

Alexander Back
Philip Bjellheim
Julia Darvelid
Elin Henriksson
Victoria Karlsson
Tove Widén



CHALMERS

Kemi och Kemiteknik
Analytisk kemi
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2017

Grafen för att förbättra kemisk avbildning av biologisk vävnad

En studie med masspektrometri

ALEXANDER BACK - aback@student.chalmers.se

PHILIP BJELLHEIM - phibje@student.chalmers.se

JULIA DARVELID - darvelid@student.chalmers.se

ELIN HENRIKSSON - elinhen@student.chalmers.se

VICTORIA KARLSSON - vickarl@student.chalmers.se

TOVE WIDÉN - wtove@student.chalmers.se

© ALEXANDER BACK, 2017.

© PHILIP BJELLHEIM, 2017.

© JULIA DARVELID, 2017.

© ELIN HENRIKSSON, 2017.

© VICTORIA KARLSSON, 2017.

© TOVE WIDÉN, 2017.

Handledare: Per Malmberg, Kemi och kemiteknik, Analytisk kemi.

Bihandledare: Yifeng Fu, Mikroteknologi och Nanovetenskap, Elektronikmaterial och system.

Examinator: Nikola Markovic, Kemi och Kemiteknik, Fysikalisk kemi.

Kandidatarbete 2017: KBTX10-17-02

Kemi och Kemiteknik

Analytisk kemi

Chalmers tekniska högskola

SE-412 96 Göteborg

Telefon +46 31 772 1000

De bilder som har använts i dokumentet, där referens ej angivits, är våra egna bilder som tagits fram från de analyser som genomförts.

Omslag: Totaljonbild av njure från SIMS.

Göteborg, Sverige 2017

Förord

Vi vill tacka vår handledare Per Malmberg för hans hjälp och tillgänglighet. Vi vill även tacka Lena von Sydow för hjälpen med laborationerna på AstraZeneca, samt Yifeng Fu för hjälpen med grafenframställningen.

Graphene to improve chemical imaging of biological tissue

1 Abstract

The aim of this study was to investigate the use of graphene as a matrix. A matrix, which is different layers of organic molecules, can be used to clarify and improve different methods of *Mass spectrometry imaging*. In this study, rat kidneys have been studied with graphene and graphene oxide as matrices to determine how easily a specific substance, in this case a drug, can be detected. Another matrix has been used for comparison. The detection has been done with the spectrometric methods *Matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI, and *Secondary ion mass spectrometry*, SIMS. Both statistical methods and analyses of ion images as well as mass spectra have been used to draw conclusions. This showed that there are significant differences between matrices and their effects on the samples. The comparisons have shown promising results for the graphene matrices but further studies are needed to evaluate under which circumstances the graphene, as a matrix, can be used optimally.

2 Sammandrag

Målet med denna studie var att undersöka om grafen kan användas för att förbättra avbildning av biologiska vävnader. För att göra detta applicerades grafen eller grafenoxid i ett tunt lager, så kallad matris, på råttjurar. Innan matrispåläggningen hade hälften av njurarna försetts med ett känt läkemedel för att kunna jämföra hur väl ett specifikt ämne kan detekteras. Proverna analyserades med de masspektrometriska metoderna *Sekundärjonsmasspektrometri*, SIMS, och *Matrisassisterad laser-desorption/ionisering*, MALDI. Från dessa metoder erhöles olika spektrum som jämfördes med bildanalyser och statistiska analyser. För att kunna dra slutsatser kring grafens funktion och egenskaper som matris jämfördes den med en annan matris. Undersökningen visade att det är signifikant skillnad mellan olika matriser och att typ av matris påverkar vilka ämnen som syns i ett spektrum. Matriser med grafen visade lovande resultat med SIMS men ytterligare studier behöver genomföras, för att kunna se under vilka förhållanden grafens användning som matris är optimal.

3 Ordlista

ANOVA - Variansanalys. *Eng.* Analysis of variance. En statistisk analysmetod där variationer inom och mellan grupper analyseras och slutsatser dras kring om det finns signifikanta skillnader mellan olika betingelser.

HCCA - *Eng.* α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. Ett ämne som kan användas i matriser.

LSD - Minsta signifikanta skillnad. *Eng.* Least significant difference. Statistisk analysmetod för parvis jämförelse av medelvärden.

MALDI - Matrisassisterad laser-desorption/jonsisering. *Eng.* Matrix-assisted laser desorption/ionization. En typ av masspektrometri där användning av en matris är nödvändig för avbildning.

PCA - Principalkomponentanalys. *Eng.* Principal component analysis. Statistisk analysmetod som påvisar variation och kan hitta mönster inom data.

POPC - *Eng.* 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. En vanligt förekommande lipid i vävnader.

SEM - Svepelektronmikroskop. *Eng.* Scanning electron microscope. En typ av mikroskop som bland annat kan skapa bilder av ett provs yta.

SIMS - Sekundärjons-masspektrometri. *Eng.* Secondary ion mass spectrometry. En typ av masspektrometri som kan användas med och utan matris.

TOF - Flygtid. *Eng.* Time of flight. En massanalysator som separerar joner med avseende på deras massor.

Innehåll

1	Abstract	i
2	Sammandrag	ii
3	Ordlista	iii
4	Syfte	1
5	Bakgrund	2
5.1	Matrix-assisted laser desorption/ionization - <i>MALDI</i>	3
5.2	Secondary ion mass spectrometry - <i>SIMS</i>	4
5.3	Skillnader mellan MALDI och SIMS	5
5.4	Grafen	5
5.5	Spin-coating	6
5.6	HTX-sprayer	6
5.7	Svepelektronmikroskopi	6
5.8	Läkemedelsdistribution	7
5.9	Dataanalys	7
5.9.1	Analysis of variance - <i>ANOVA</i>	7
5.9.2	Least Significant Difference - <i>LSD</i>	8
5.9.3	Principal component analysis - <i>PCA</i>	9
5.10	Jonbild	9
6	Avgränsningar	11
7	Metod	12
7.1	Litteraturstudie	12
7.2	Laborativt arbete	12
7.2.1	Provpreparering	12
7.2.2	Tillverkning av grafenoxid	13
7.2.3	Tillverkning av grafen	13
7.2.4	Applicering av HCCA-matris	13
7.2.5	Applicering av grafenmatris	13
7.2.6	Applicering av grafenoxidmatris	13
7.2.7	Analys med MALDI	14
7.2.8	Analys med SIMS	14
7.3	Dataanalys	14
8	Resultat och tolkning	17
8.1	Svepelektronmikroskopi	17
8.1.1	Grafen	17
8.1.2	Grafenoxid	18
8.2	MALDI	21
8.3	SIMS	24
8.3.1	Statistisk analys med ANOVA och LSD	32

8.3.2	Statistisk analys med PCA	36
8.4	Sammanfattande diskussion	38
9	Slutsats	40
10	Referenser	41
A	Bilaga - PCA	I
B	Bilaga - ANOVA	V

4 Syfte

Studien syftar till att undersöka om användandet av ämnet grafen, som matris, kan förbättra detektionsförmågan av molekyler vid kemisk avbildning. Detta genom att använda de spektrometriska teknikerna MALDI och SIMS för att jämföra och analysera vävnadssnitt med och utan matriser av grafen.

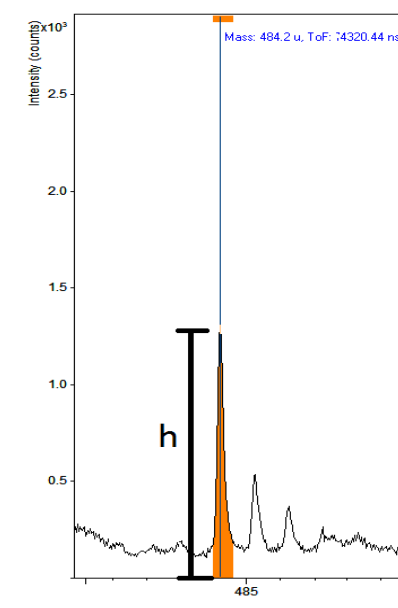
5 Bakgrund

I denna undersökning utvärderas grafens funktion som matris vid användandet av två välbeprövade metoder för avbildande masspektrometri, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI, och *Secondary ion mass spectrometry*, SIMS.

Avbildande masspektrometri är en analysmetod som kan användas för att identifiera och visualisera fördelningen av olika molekyler i celler eller vävnader. Med hjälp av masspektrometri kan ett masspektrum erhållas där molekylernas vikt och intensitet åskådliggörs. Molekylerna uttrycks som toppar i ett masspektrum. Topparnas höjd, se figur 5.1, visar intensiteten av molekylerna i vävnaden och topparnas placering i masspektrat visar dess vikt. Vetskap om molekylernas vikt gör att de kan identifieras. Analysen sker utan användning av markörer, såsom antikroppar, vilket annars är ett vanligt sätt att detektera vissa organiska molekyler [1]. Avsaknaden av markörer kan underlätta tillvägagångssättet vid analys och vara billigare samt mindre tidskrävande [2]. Idag används masspektrometri bland annat för att söka efter och identifiera sjukdomar i vävnader.

Vid avbildande masspektrometri visualiseras ett eller flera ämnens intensitet utifrån erhållna masspektra. Varje pixel i avbildningen motsvaras av ett masspektrum. Intensiteten på det valda ämnet illustreras i respektive bildpunkt med hjälp av en färgskala. På så vis skapas en bild av fördelningen av det valda ämnet i provet. Detta möjliggör en enkel tolkning av resultatet [3].

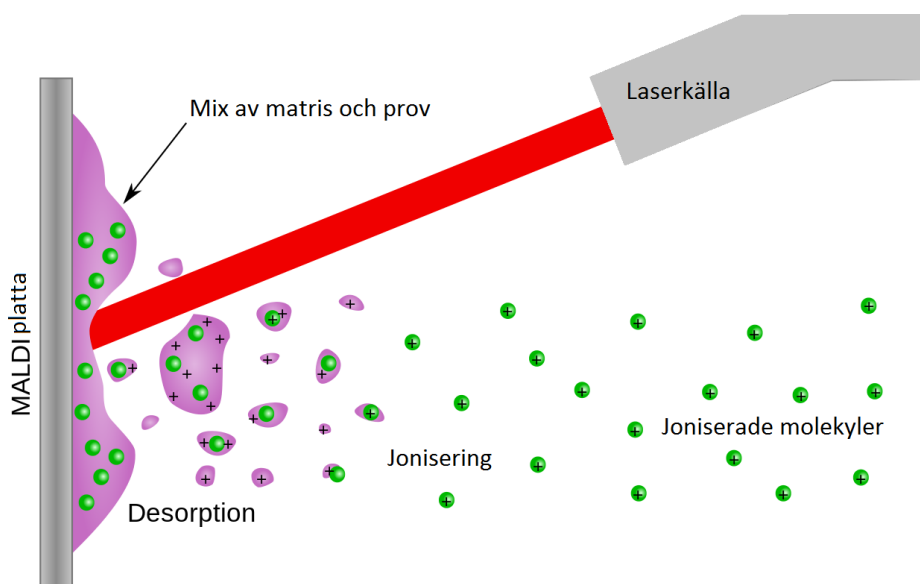
För att utvärdera användandet av grafen som matris kommer snitt av råttnjurar med och utan pålagt läkemedel att analyseras. Även prover med HCCA som matris och prover utan matris kommer att analyseras för jämförelse.



Figur 5.1: En bild som visar höjden av en molekyls masstopp i ett masspektrum.

5.1 Matrix-assisted laser desorption/ionization - MALDI

Vid användandet av MALDI täcks provet med en matris, som är ett tunt lager konventionellt sett bestående av organiska molekyler. Vid analys beskjuvs provet med en laserpuls, se figur 5.2. Matrisens uppgift är att bevara energin från laserstrålen och göra det möjligt för analyten att joniseras. Efter joniseringen används en massanalysator, i detta fall en *Time of flight*, TOF, för att separera jonerna efter storlek på massan, m . Dessa detekteras och masspektra skapas. Teorin bakom separationen med TOF bygger på att alla molekyler får en laddning, z , vid joniseringssteget och sedan accelereras med samma kraft i ett elektriskt fält. Mindre molekyler med lägre massa får en högre hastighet än större molekyler, vilket medför att deras flygtid blir kortare och de når detektorn tidigare. Förhållandet m/z skapar separationen [3].



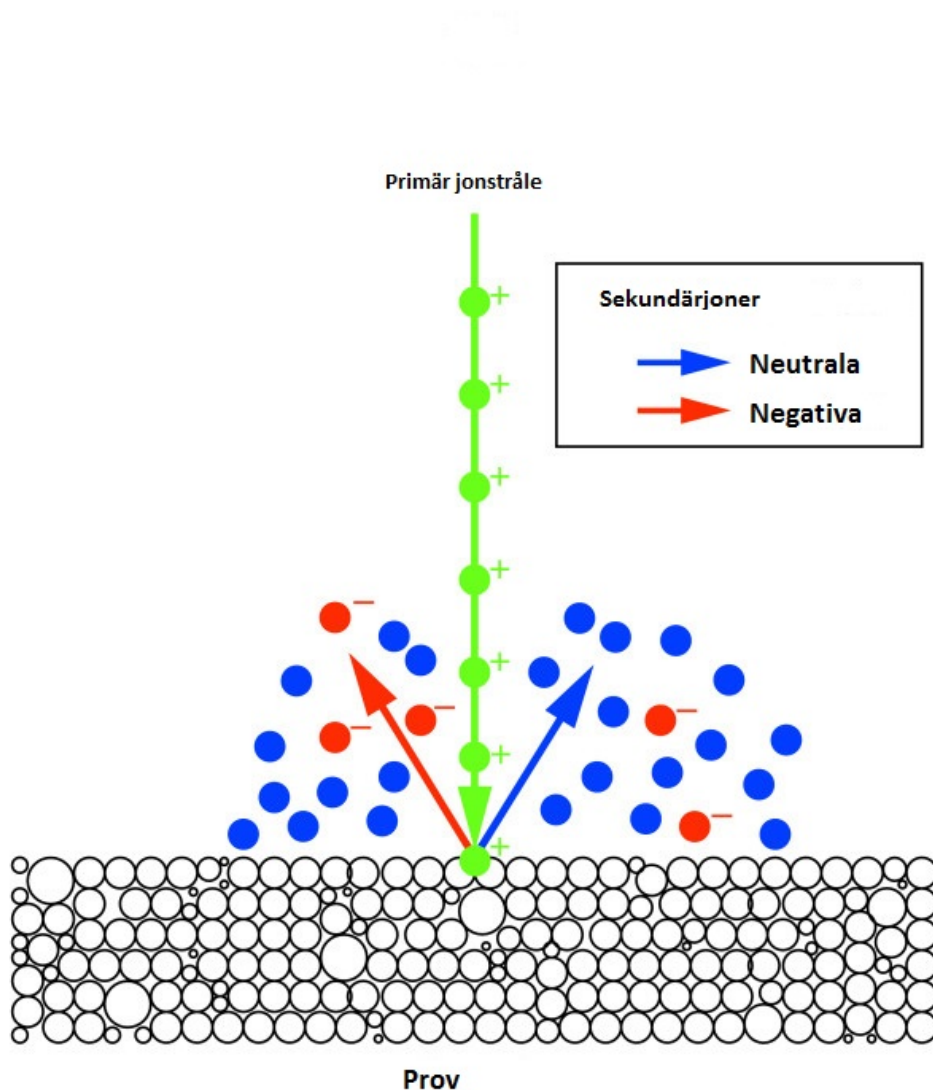
Figur 5.2: En överskådlig bild av hur MALDI fungerar [4].

En begränsning i masspektrometri är att joniseringen belastar analyterna, vilket kan resultera i att molekylerna i provet fragmenteras. Fragmentationen gör att större molekyler blir svårare att detektera då de har brutits ned till mindre molekyler. MALDI har en relativt skonsam joniseringsmetod, vilket resulterar i att större molekyler i hög grad kan joniseras utan att fragmenteras. Joniseringen med MALDI resulterar därför oftast i ett masspektrum med färre molekylfragment och fler joniserade molekyler med högre massa [3].

Matrisen i sig kan delokalisera molekyler och orsaka bakgrundsstörningar. Störningarna som orsakas av matrisen består av fragment av matrisen som har brutits ner. Matrisfragment som följer med i avläsningen skapar problem eftersom de är i samma storlek som molekyler i det lägre intervallet av masspektret, cirka 0-300 Da. På så vis kan de ge upphov till felaktig avläsning av provets masspektrum [3].

5.2 Secondary ion mass spectrometry - *SIMS*

SIMS använder en jonstråle för att jonisera provet. Jonstrålen fokuseras på ytan av provet och vid kollision förs energi över från jonerna till analyten, se figur 5.3. Molekylerna på ytan av provet joniseras och kan massanalyseras av exempelvis en TOF. SIMS kräver inte en matris men har det upptäckts att användning av en konventionell matris ger förbättrat resultat [5].



Figur 5.3: En överskådlig bild av hur SIMS fungerar [6].

Strömstyrkan på jonstrålen svarar mot antalet joner som strålen skickar ut på provet. Strömstyrkan kan variera något mellan olika SIMS-analyser. Ett högre antal joner i strålen resulterar i ett högre antal sekundärt joniserade molekyler som lämnar provet. Antalet molekyler som lämnar provet ger upphov till intensiteten på topparna i ett masspektrum.

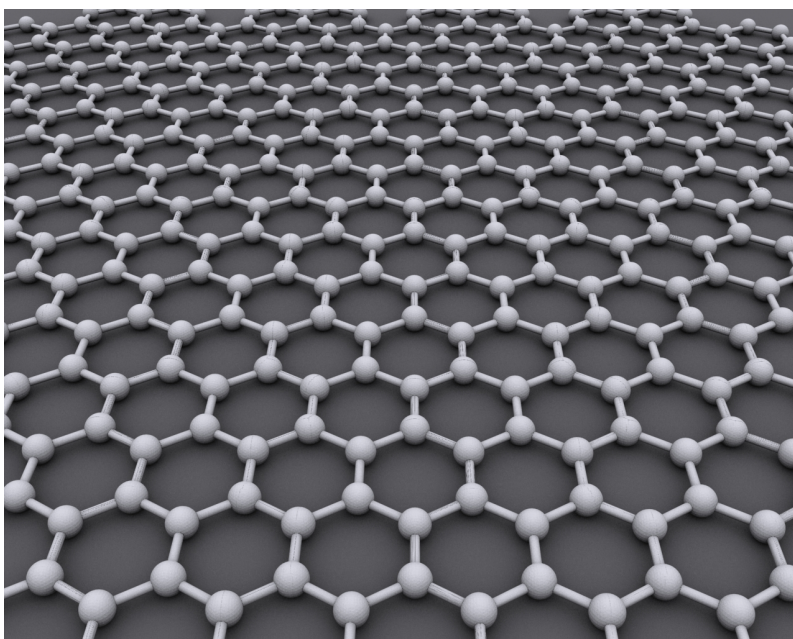
5.3 Skillnader mellan MALDI och SIMS

Främsta skillnaden mellan dessa två analysmetoder är att MALDI kräver användandet av en matris för analys, vilket inte behövs för SIMS. En annan skillnad är att MALDI ger en starkare detektionssignal än SIMS. MALDI joniserar ett större samt djupare område med varje laserpuls vilket resulterar i att fler molekyler joniseras. Det stora joniseringsområdet medför att varje pixel i avbildningen som skapas med MALDI är större och upplösningen blir sämre.

Fördelen med MALDI:ns joniseringsmetod är att skillnaden mellan bakgrundsbrus och detektionssignal blir större. Bakgrundsbrus är den konstanta störningen av mindre toppar som finns i ett masspektrum. Om detektionssignalen är högre i förhållande till bakgrundsbruset erhålls ett tydligare masspektrum. SIMS har svagare detektionssignal, delvis på grund av att joniseringsdjupet är lägre och att varje joniseringsyta är mindre. Den svagare detektionssignalen medför att bakgrundsbrus försvårar avläsning av masspektra [7].

5.4 Grafen

Grafen har en hexagonal struktur av kolatomer och en tjocklek på ett atomlager, se figur 5.4. Strukturen medför att grafen som ämne har hög elektrisk- samt värmeledningsförmåga [8]. Grafen har visats kunna användas som matris i MALDI, både vid analys av lösningar [9] och av vävnader [10]. Dess elektriskt ledande och värmeledande förmåga gör det lättare för laserpulsen i MALDI att jonisera provet under matrisen. Som matris ökar grafen energiöverföringens effektivitet i jämförelse med en konventionell matris och leder till lägre fragmentation av molekyler. Förhoppningen är att en grafenmatris ska minska bakgrundsstörningar orsakade av matrisen tack vare dess enkla uppbyggnad av enbart kol [9].



Figur 5.4: Figur över grafens struktur [11].

Applicering av grafen på ett vävnadsprov är en utmaning då vävnaden har en relativt skrovlig yta (~ 500 nm - 1 μ m). Skrovligheten är ett mått på skillnaden mellan provets högsta och lägsta yta. Vid tillskärning av provet är det svårt att få en jämnt beskuren provyta.

När grafen läggs på vävnaden finns en risk att det bildas en kristallstruktur istället för ett jämnt skikt vilket försämrar avläsningen. Vid kristallisering av grafen måste laser- eller jonpulsenergi ta sig igenom en grafitstruktur, vilket kräver mer energi. Eventuellt kan detta leda till en misslyckad jonisering av provet. För att minska risken för kristallisering bör det framställas på kemisk väg, där en lösning av grafen fås. Då kan ett homogent lager, bestående av små grafenflagor, täcka vävnaden [9].

Målet är att en grafenmatris ska underlätta jonisering av analyten och avläsning av masstoppar. I en nyligen genomförd studie för att studera analytlösningar har grafenoxid använts vid SIMS [12]. Därför ska även grafenoxid testas som matris i detta projekt för att se hur den påverkar resultatet för avbildning.

5.5 Spin-coating

Spinbeläggning, från engelskans *Spin-coating*, är en metod där en lösning appliceras som en enhetlig tunn film på ett prov. Appliceringen sker genom att provet läggs på en roterande basplatta där det sugas fast med ett undertryck innan basplattan börjar rotera. Lösningen som ska appliceras droppas på provet och plattan sätts i rotation [13]. Spridningen av lösningen varierar beroende av viskositeten och den centrifugala drivkraften vilken regleras av rotationshastigheten [14].

5.6 HTX-sprayer

Vid applicering av en matris är det önskvärt att använda sig av metoder som ger en tunn och jämn matris samt att appliceringen ska vara relativt tidseffektiv. Användning av en HTX-sprayer är därför numera en vanlig appliceringsmetod vid exempelvis MALDI, då den snabbt kan skapa homogena matrislager med hög reproducerbarhet [15]. En HTX-sprayer värmer och trycksätter en matrislösning som sedan sprayas enligt önskade preferenser, direkt på provet. Genom att både värma samt öka trycket på matrislösningen bidrar detta till flera fördelar för avbildning. Bland annat möjliggör uppvärmning att matrisen sjunker djupare in i provet och att bildningen av större kristallstrukturer undviks. En mer precis och direkt spraystråle uppnås när lösningen är trycksatt, vilket förbättrar placeringen av matrisen över provet.

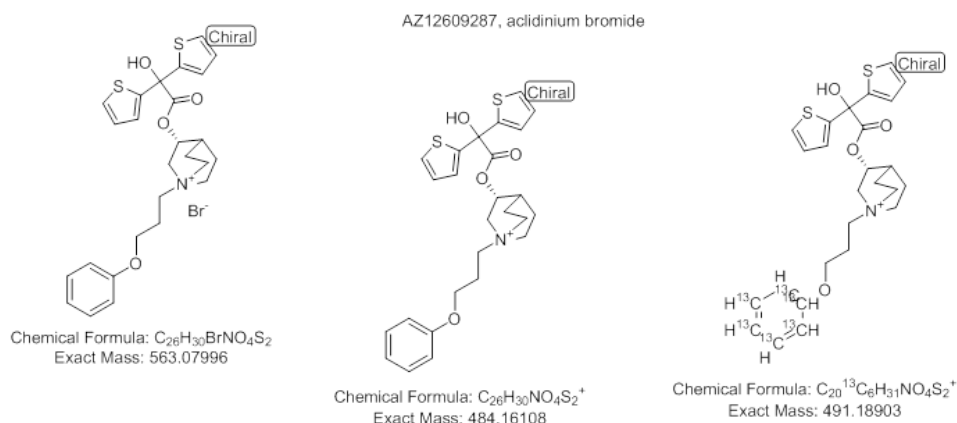
5.7 Svepelektronmikroskopi

För att observera ett provs yta och på så vis få en bild av hur väl appliceringen av en matris fungerat är svepelektronmikroskopi en lämplig analysmetod. Med denna metod fås en bild av ytan genom att låta en fokuserad stråle med elektroner svepa över provet. Detektion av exciterade elektroner sker samtidigt som strålen färdas över provytan, vilket ger en punkt-till-punkt avbildning av provet [16].

5.8 Läkemedelsdistribution

Ett användningsområde för avbildande masspektrometri är att analysera distributionen av läkemedel. Avbildande masspektrometri har fördelarna, jämfört med andra metoder, att i samma analysbild ge resultat för både mängden och fördelningen av läkemedlet. Metaboliter och andra molekyler av intresse, såsom proteiner eller lipider kan också observeras i samma bild. Det är inte heller nödvändigt att märka in molekylen av intresse, något som annars måste göras med till exempel antikroppar [2].

För undersökning om hur väl läkemedel kan detekteras i vävnader med hjälp av masspektrometri används i denna studie aclidiniumbromid som är ett inhaleringsläkemedel [17]. Molekylen har den kemiska formeln $C_{26}H_{30}BrNO_4S_2$. Det är den joniserade molekylen som detekteras i masspektrometri. Denna har en molekylvikt på 484,16 Da, vilket ligger inom ett intressant intervall. I figur 5.5 syns, från vänster till höger, strukturformlerna för aclidiniumbromid i sin ursprungliga form, joniserade form och en isotop av den joniserade formen.



Figur 5.5: Strukturformel för aclidiniumbromid, från vänster till höger i sin ursprungliga form, joniserade form och en isotop av den joniserade formen.

Läkemedelsmolekylen och dess funktion ligger inte i fokus på annat sätt än för att kunna se hur lätt den kan detekteras och ifall detta varierar med olika matriser och koncentrationer.

5.9 Dataanalys

Efter körning av proven i SIMS eller MALDI krävs en statistisk analys av datan från masspektrometrarna för att undersöka om det är någon signifikant skillnad mellan de erhållna resultaten för de olika matriserna.

5.9.1 Analysis of variance - ANOVA

En metod för att utvärdera data är *Variationsanalys*, mer känt som *Analysis of Variance*, ANOVA. I ANOVA analyseras variation inom och mellan grupper och slutsatser dras kring om det finns signifikanta skillnader mellan olika betingelser [18]. ANOVA tar normalt hänsyn till två former av betingelser. Den första är behandlingar, på engelska kallat treatments,

vilket är en huvudsaklig källa till variation som ofta är den som framförallt ska undersökas. Den andra typen av betingelse är olika block, vilket är ett set med mätningar där ursprunget är detsamma. Vid analys av masspektrometrisk data skulle behandlingarna motsvaras av de olika matriserna och blocken av de olika topparna.

För behandlingarna, i detta fall de olika matriserna, ska en *kvadratsumma*, från engelskans *sum of squares*, SS beräknas enligt ekvation 5.1.

$$SS_{Matris} = \frac{1}{b} \sum_{j=1}^a y_{.j}^2 - \frac{y_{..}^2}{N} \quad (5.1)$$

Sum of squares ska även beräknas för blocken, i detta fall de olika masstopparna, enligt ekvation 5.2.

$$SS_{Toppa} = \frac{1}{a} \sum_{i=1}^b y_{i.}^2 - \frac{y_{..}^2}{N} \quad (5.2)$$

De olika indexen för y talar om vad som summeras. Med $y_{i.}$ menas att alla kolumner i en tabell med dataset summeras, $y_{.j}$ alla rader och $y_{..}$ alla värden i hela tabellen. I utvärderingen delas topparna upp i kolumner och de olika matriserna delas upp i rader. Det som jämförs är intensiteten på topparna, dels mellan matriserna samt mellan de olika topparna. N är det totala antalet värden i tabellen, a är antalet rader, det vill säga antalet olika matriser, och b är antalet olika kolumner vilket motsvaras av antalet olika toppar. Sum of squares beräknas även för den totala intensiteten enligt ekvation 5.3.

$$SS_{Tot} = \sum y_{..}^2 - \frac{y_{..}^2}{N} \quad (5.3)$$

Utifrån det beräknas sum of squares för felet enligt ekvation 5.4.

$$SS_{Error} = SS_{Tot} - SS_{Matris} - SS_{Toppa} \quad (5.4)$$

De olika värdena på sum of squares används sedan för att beräkna de motsvarande medelkvadraterna, *mean square*, vilket är värdet för sum of squares dividerat med antalet frihetsgrader för betingelsen. Mean square-värdena används sedan för att genomföra ett F-test. Ett F_0 -värde beräknas genom att värdet på mean square för behandlingen divideras med värdet på mean square för felet. F_0 -värdet jämförs sedan med ett statistiskt F-värde som hämtas från tabell utefter frihetsgraderna på behandlingen och felet samt vilken konfidensgrad som önskas. Ifall F_0 -värdet är större än jämförelsevärdet finns det en statistiskt signifikant skillnad mellan de olika behandlingarna. På motsvarande sätt kan även eventuell signifikant skillnad mellan blocken utvärderas [18].

5.9.2 Least Significant Difference - *LSD*

Minsta signifikanta skillnad mer känt som *Least significant difference*, *LSD*, är en typ av t-test för parvis jämförelse av medelvärden. *LSD* används med fördel efter att ett F-test i ANOVA har visat sig vara signifikant. I *LSD* beräknas differensen mellan medelvärdena för två prov. Om absolutbeloppet av differensen är större än *LSD*-värdet är skillnaden mellan proven signifikant. *LSD*-värdet beräknas enligt ekvation 5.5 vilken kan härledas från teststatistikan för t-test [18].

$$LSD = t_{\alpha/2, N-a} \sqrt{\frac{2MS_E}{n}} \quad (5.5)$$

t -värdet hämtas från tabell beroende på konfidensgrad samt frihetsgrad. MS_E är mean square för felet och n är antal observationer per behandling.

5.9.3 Principal component analysis - PCA

För att hitta korrelationer mellan erhållna resultat kan *principalkomponent-analys*, mer känt som *principal component analysis*, PCA tillämpas. PCA är en teknik som används för att lyfta fram variation och hitta mönster inom data. Detta bygger på en statistisk procedur som använder en ortogonal transformation av vektorer för att skapa en komponent. För att jämföra denna komponent med liknande data skapas ännu en komponent och variationen mellan komponenterna visualiseras i olika typer av grafer [19].

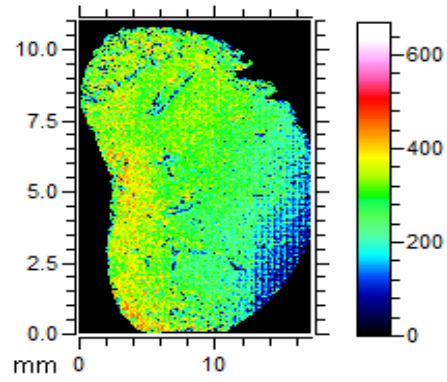
För denna studie utgör masstoppsdatan från de olika vävnadsproven vektorer som alla jämförs med varandra. Poäng-plot, mer känt som score-plot är den graf som enklast används för att få en snabb uppfattning av likheter och olikheter mellan jämförda matriser. Här placeras exempelvis de olika matriserna i en cirkel inom ett 95% signifikans-intervall, det vill säga om matrisen är inom cirkeln stämmer korrelationen till 95%. Placeringen inom cirkeln visar hur lika matriserna är. Om två matriser placeras nära varandra har de liknande egenskaper.

En annan typ av graf är laddnings-plot, mer känd som loading-plot. Den visar all data som vektorerna innehåller och hur de varierar i förhållande till varandra. Denna typ av plot visar även olikheter i intensitet mellan molekyler och hur denna data korrelerar till respektive matris. Om datan är placerad på samma ställe som matrisen i score-plotten tenderar denna data att finnas mer i denna typ av matris.

För detta projekt är PCA användbart för att hitta likheter samt olikheter mellan de olika matriserna och för att hitta korrelationer mellan dem.

5.10 Jonbild

En jonbild visar fördelningen av enstaka alternativt flera joniserade ämnen. En totaljonbild visualiserar alla joniserade ämnen i vävnaden. I jonbilden summeras de spektrum som fås från varje pixel till en bild, se figur 5.6. Bilder kan analyseras genom att studera fördelningen och intensiteten. Dessa bestäms genom att betrakta färgskillnaden, färgfördelningen och hur spridda molekyler är. Beroende på vilken intensitet molekylen har, i en punkt på provet, åskådliggörs den med en viss färg. Vilken färg som motsvarar vilken intensitet syns i färgskalan till höger om bilden. Om pixeln till exempel är svart innebär det en låg intensitet av molekylen i det området. Om pixeln istället är vit innebär det en hög intensitet av molekylen i det området.



Figur 5.6: En bild som visar en totaljonbild över den totala fördelningen av molekyler. Till höger om bilden syns färgskalan.

6 Avgränsningar

De vävnader som valdes för dataanalysen var råttnjurar. Fokus för den statistiska analysen var resultaten från SIMS då data kunde erhållas och analyseras med tillgänglig programvara. Datan från MALDI kunde inte analyseras på samma sätt då denna använder en annan programvara med andra funktioner. Datan var därför svår att exportera till statistisk mjukvara. All insamlad data kunde inte analyseras. För studiens syfte valdes spektrum med intressanta skillnader ut för undersökning. Läkemedlet, acridiniumbromid, hade kunnat bytas ut mot ett annat ämne med lämplig molekylvikt. Detta då undersökningen syftar till att se skillnader i intensitet, för *något* ämne, vid användandet av olika matriser. Distributionen av läkemedlet undersöktes inte då läkemedlet inte fördelats naturligt i organet utan applicerats i efterhand.

7 Metod

Följande kapitel hanterar de metoder som användes under studiens gång. Översiktligt bestod metoden av litteraturstudier, laborativt arbete och dataanalyser.

7.1 Litteraturstudie

Litteraturstudier genomfördes kontinuerligt. I början var syftet att skapa förståelse kring ämnet medan det senare främst var för att verifiera faktadetaljer samt hitta referenser i samband med rapportskrivandet.

7.2 Laborativt arbete

De vävnader som undersöktes var råttnjurar. Proven analyserades vid tre typer av betingelser. Dessa var: typ av masspektrometer, typ av matris och närvaron av läkemedel.

Masspektrometrarna som användes var MALDI och SIMS. Matriserna var HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), grafen och grafenoxid. Vid analys med SIMS undersöktes prover även utan matris vilket inte är möjligt i MALDI. För varje kombination av masspektrometer och matris, se tabell 7.1, genomfördes analyser av åtminstone två prov, ett med läkemedel och ett utan. På ett objektglas var fyra vävnadsprover placerade vilket resulterade i att de fyra proverna fick samma matris.

Tabell 7.1: Försökupplägget översiktligt.

		Masspektrometer	
		MALDI	SIMS
Matris	Ingen	Nej	Ja
	HCCA	Ja	Ja
	Grafen	Ja	Ja
	Grafenoxid	Ja	Ja

7.2.1 Provpreparering

Prepareringen av proven började med vakuumbörning av de frysta vävnaderna. Efter torkningen applicerades olika koncentrationer av acclidiniumbromid på vävnaderna. Koncentrationerna valdes för att de skulle kunna upptäckas med avbildande masspektrometri, vilket möjliggör att eventuella skillnader hos olika matriser kan observeras. Koncentrationerna som användes var 10 μ M, 5 μ M och 1 μ M och dessa droppades på hälften av proverna. Övriga prover användes som kontroller. Dessa koncentrationer applicerades enbart på de prover som var utan matris, med HCCA-matris och grafenmatris. För beredningen av grafenoxidmatrisproverna användes koncentrationerna 1 μ M och 0,2 μ M då det inte fanns tillgång till de tidigare nämnda koncentrationerna.

7.2.2 Tillverkning av grafenoxid

Vid syntetisering av grafenoxid användes 4 g grafit, 92 ml (98%) H_2SO_4 , 2 g NaNO_3 och 12 g KMnO_4 enligt Hummers metod [20]. Den erhållna grafenoxidlösningen reducerades med vitamin C och polyvinylalkohol för att erhålla en bättre suspension [21].

7.2.3 Tillverkning av grafen

Suspensionen med grafenoxid användes även till framställningen av grafenlösningen. Grafenlösningen bereddes med vakuumfiltrering genom ett poröst filterpapper av polykarbonat. Porerna i filterpappret hade en diameter på 3 μm . Koncentrationen på grafenlösningen styrdes av filtreringsvolymen samt koncentrationen av grafenoxidsuspensionen. Filterpappret löstes sedan upp i ren aceton och en grafenlösning erhöles [21].

Grafenlösningen fick en fällning av grafen. Fällningen späddes med vatten för att lösas upp. Blandningen behandlades med ultraljud för att skaka sönder grafenklumparna. Detta var dock inte tillräckligt och etanol tillsattes för att underlätta upplösningen. Blandningen behandlades återigen med ultraljud. En del av grafenet löste sig, även om klumpar fanns kvar. En del av lösningen applicerades på de första vävnadsproven medan resten fortsatte att behandlas med ultraljud. Detta kan ha gett upphov till en skillnad i grafenkoncentration då mer av grafenfällningen hann lösas upp innan applicering på de senare proven.

7.2.4 Applicering av HCCA-matris

HCCA-matrisen applicerades med hjälp av en HTX-sprayer. Vid appliceringen med HTX-sprayern värmdes HCCA-lösningen (7 mg/ml, 50% acetonitril, 0,1% trifluorättiksyra) till 85°C och trycksattes till 10 psi. Följande flödesinställningar valdes för körning av HTX-sprayern: pumpens flödeshastighet var 0,2 ml/min, hastigheten var 1100 mm/min och spraystrålen var av fin sort. Matrisens densitet var 0,382 mg/cm². Vid körning varierades spraymetoden från att sprayas vertikalt till att varannan gång sprayas horisontellt. Totalt upprepades detta tre gånger, vilket innebär att det totalt var sex lager matris på provets yta. Spårmellanrum, på engelska track spacing, som är hur strålen kommer flyttas i x-led, sattes till 2 mm. Måtten som sprayern utgick från vid appliceringen var i x-led 0-95 mm samt i y-led 0-80 mm.

7.2.5 Applicering av grafenmatris

Grafenmatrisen applicerades på proverna genom spin-coating. Grafenlösningen droppades på provet som placerats på en basplatta. Provet roterades sedan med en hastighet av 1000 rpm i 30 sekunder. Proverna med grafenmatris studerades sedan i svepelektronmikroskop för att undersöka hur jämn påläggningen blev.

7.2.6 Applicering av grafenoxidmatris

Grafenoxidmatrisen applicerades, till skillnad från grafenmatrisen, med en HTX-sprayer. Då HTX-sprayern kräver lösliga matriser var det inte möjligt att använda den för att applicera grafenlösningen då grafen är svårlöslig i vatten. Grafenoxiden kunde däremot lösas i vatten och användes i HTX-sprayern.

Två koncentrationer av grafenoxid bereddades. Den ena med 3 mg/ml grafenoxid löst i vatten, den andra med 1,5 mg/ml grafenoxid löst i 25% acetanitril och 75% vatten. Grafenoxidlösningen värmdes till 85°C och trycksattes till 10 psi. Följande flödesinställningar valdes för körning av HTX-sprayern: pumpens flödeshastighet sattes till 0,2 ml/min men sänktes till 0,15 ml/min för att slutligen ställas in till 0,1 ml/min. Flödeshastigheten ändrades för att kompensera att mottrycket i HTX-sprayern ökade. Hastigheten var 1100 mm/min och matrisens densitet var 0,082 mg/cm².

Samma spraymetod som vid appliceringen av HCCA-matrisen upprepades. Det var alltså totalt 6 lager av grafenoxidmatris på provet. Track spacing sattes som tidigare till 2 mm och appliceringsytan var i x-led 0-95 mm och i y-led 0-80 mm. Proverna studerades senare med svepelektronmikroskop för att undersöka appliceringen.

7.2.7 Analys med MALDI

Objektglasen monterades på en provplatta och analyserades sedan i en MALDI av modell *Bruker Ultraflextreme IV*. Laserpulsens testsköts på en yta som inte skulle observeras. Med instrumentets mjukvara *FlexImaging* kalibrerades MALDI:n, så att laserstrålen sköt på det önskade området på objektglaset. Därefter kördes MALDI:n och data erhöles. Då analys med MALDI kan ta många timmar, om stora områden ska analyseras, har mindre områden valts för analys i detta arbete.

7.2.8 Analys med SIMS

Vid analys med SIMS av modellen *IONTOF.SIMS 5*, analyserades både prover med matris och prover utan matris. Alla prover strålades med en jonstråle av Vismut, Bi₃⁺⁺. En strömstyrka på 0,35 pA användes för proverna med grafenmatris, 0,34 pA för proverna med grafenoxid och 0,24 pA för proverna med HCCA-matris samt för proverna utan matris.

Objektglaset med prover som skulle analyseras placerades i en provhållare. Analysområdet bestämdes med kameran som finns i SIMS. Området som valdes täckte hela vävnaden och lite av det utomliggande området. Analysen påbörjades och data erhöles.

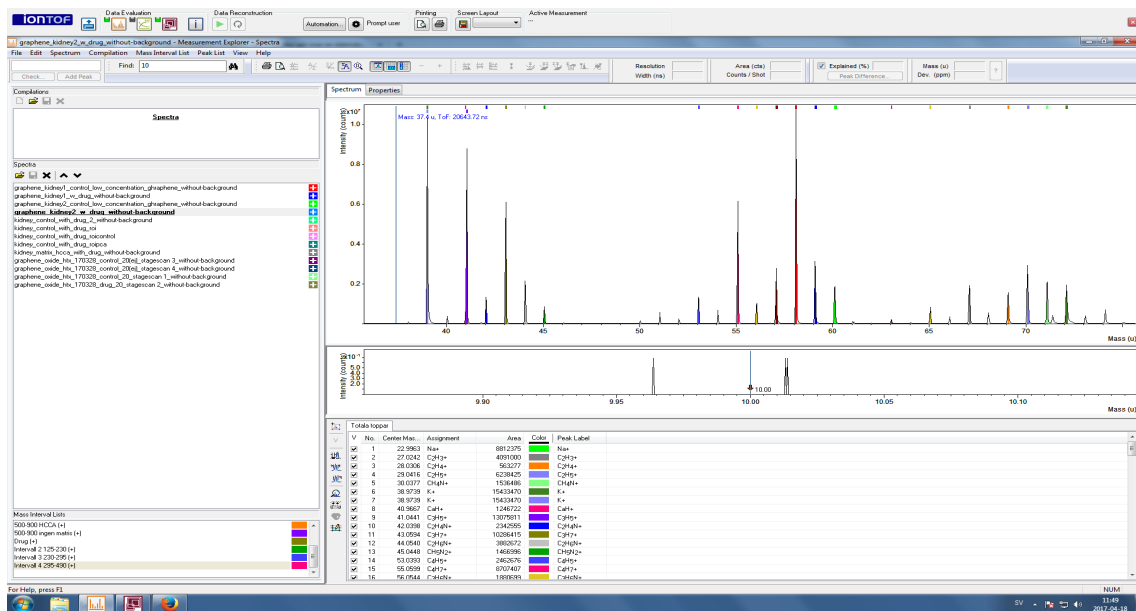
7.3 Dataanalys

För analysen av den data som erhöles från SIMS användes programmet *Measurement Explorer*. Med programmet redigerades bilderna från SIMS för att inte ta med signalerna från objektglaset. Enbart signalerna från vävnadsprovet var av intresse för analys. Bildredigeringen utfördes genom att manuellt rita en kontur runt vävnaden och markera området för den önskade analysytan. Från analysytan togs en totaljonbild fram. Totaljonbilden användes för att få information om hur väl provet hade joniserats. Det skapades även jonbilder med läkemedelsmolekylen för de olika matriserna. Bilderna användes för att studera hur väl läkemedelsmolekylen visuellt kunde detekteras.

För att varje ämnes massa skulle motsvara rätt topp kalibrerades masspektrumet. Kalibreringen utfördes med hjälp av C, C₂⁺, C₃⁺ och C₂₇H₄₅⁺, då dessa ämnen har toppar som är enkla att urskilja i ett masspektrum. Vanligtvis väljs kända ämnen att kalibrera mot. Kolesterol

och koljoner valdes då de har en hög respektive låg massa och spänner över en stor del av spektrumet. För att alla masspektrum skulle kunna analyseras under samma förutsättningar normaliserades varje masspektrum med den strömstyrka som proverna beskötts med. På detta sätt erhöles alla masspektrum med en gemensam intensitetskala där intensiteten motsvarar antal joner [22].

Efter att kalibreringen utförts och strömstyrkan angetts för alla masspektrum skapades olika masslistor där utvalda toppar i spektrumet markerades, se figur 7.1. De utvalda topparna, i varje masslista, färglades i spektrumet. En masslista kunde sedan appliceras på olika prover för att se om samma toppar förekom där. När en masslista hade skapats kunde data som beskriver intensiteten för varje ämne i masslistan, från de valda proven, exporteras.



Figur 7.1: En bild som visar programvaran *Measurement explorer*, som illustrerar markerade toppar i spektrumet då de finns med i masslistan som syns nedanför.

En masslista skapades genom att alla toppar i ett provs spektrum, som hade en intensitet minst tre gånger högre än bakgrundstoppornas intensitet, markerades. Masslistan applicerades sedan på ett nytt prov och toppar som inte redan var med i masslistan adderades. Detta upprepades för alla prov så att den resulterande masslistan innehöll alla toppar som var tydliga enligt det tidigare nämnda kriteriet. Denna masslista täckte hela spektrumintervallet. Datan från masslistan exporterades till en excel-fil för att sedan användas för att göra PCA-undersökning med programmet *SIMCA*.

För analys med ANOVA och LSD skapades inom intervallet 500-900 Da fyra olika masslistor, en för varje typ av matris: grafenmatris, grafenoxidmatris, HCCA-matris och ingen matris. Intervallet valdes då grafen och grafenoxid visade sig ge tydliga spektrum inom detta område, vilket SIMS vanligtvis inte gör eftersom SIMS fungerar bäst för mindre molekyler [23]. Intervallmasslistorna skapades, likt tidigare, manuellt utefter hur tydligt topparna kunde urskiljas. Topparna valdes ut och adderades till masslistan. Listan som skapades applicerades sedan på ett nytt prov, av samma matristyp och toppar som inte förekommit tidigare lades

till i listan. Detta upprepades för de spektrum som tillhörde prover som hade samma typ av matris. Intervallmasslistorna som skapades innehöll därför bara de toppar som förekom i något av proven för korresponderande matristyp. De olika masslistorna applicerades sedan på alla prov, oavsett matristyp. På så vis kunde förekomsten och intensiteten av olika toppar jämföras mellan proven och skillnader mellan de olika matriserna upptäckas.

Datan från de fyra intervallmasslistorna exporterades sedan till ett excel-dokument. I *Excel* genomfördes statistiska analyser enligt metoderna ANOVA och LSD. I både ANOVA och LSD användes konfidensgrader på 95% samt 99%.

8 Resultat och tolkning

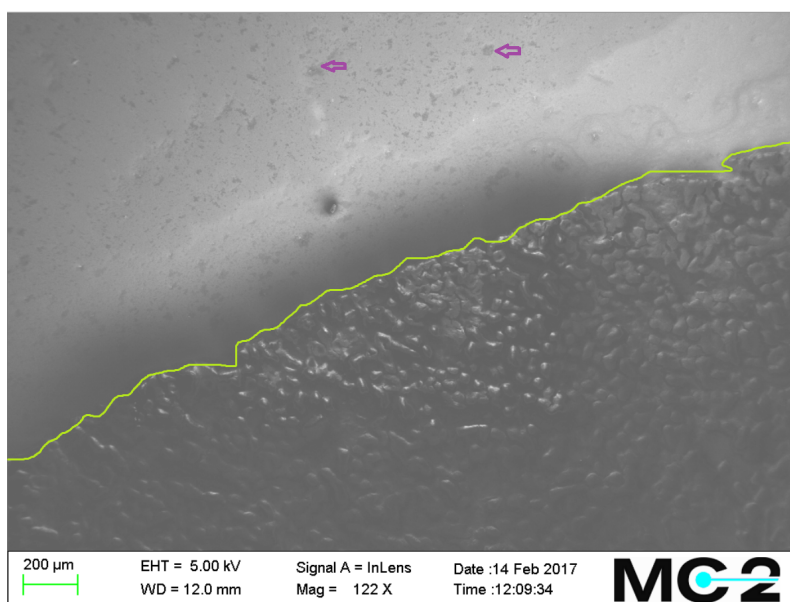
Resultaten som följer inleds med visuella bildjämförelser med SEM, MALDI och SIMS. Fokus kommer därefter läggas på masspektrum i SIMS där bland annat läkemedelsmolekylens intensitet jämförs mellan de olika matriserna. Resultatet avslutas sedan med statistisk analys av de olika masstopparna för att se om det finns en signifikant skillnad mellan matriserna. Den statistiska analysen avslutas med en PCA-undersökning, för att försöka se trender i vad som skiljer de olika matriserna åt.

8.1 Svepelektronmikroskopi

Under produktionen av grafen- och grafenoxidlösningen observerades med blotta ögat att grafenlösningen var svagt grå medan grafenoxidlösningen var betydligt mörkare. Detta var en indikation på att grafenoxiden kan ha varit av högre koncentration. Även olika appliceringsmetoder användes vilket kan ha orsakat skillnader mellan matriserna i homogenitet och tjocklek. För att undersöka hur väl appliceringen av grafen- samt grafenoxidmatriserna skett, studerades proverna i ett svepelektronmikroskop, SEM. Bilder på proverna med matriserna tagna med SEM presenteras nedan.

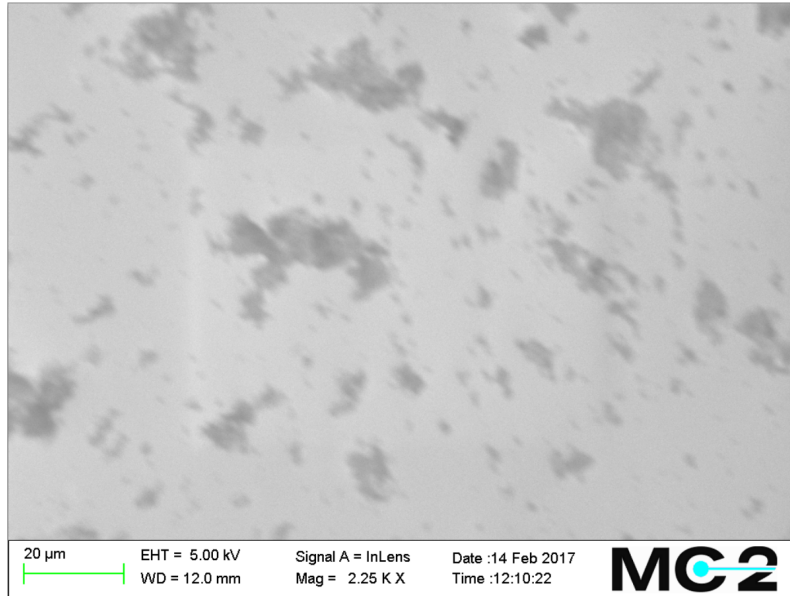
8.1.1 Grafen

En bild direkt på njuren gav inte någon relevant information om grafenmatrisen eftersom både grafenet och njuren har mörk färg i SEM. Istället observerades områden med objektglas och njure bredvid varandra. I figur 8.1 syns njure och objektglas täckt med grafenmatris. Där syns grafenet som små utspridda grå flagor på det vita objektglaset.



Figur 8.1: SEM-bild av grafen på råttnjure och objektglas. Från vänster övre hörn till den gröna kanten syns objektglaset med grafenflagor märkta med lila pilar. Från den gröna kanten till det nedre högra hörnet syns råttnjuren. 122 gånger förstoring.

Figur 8.2 visar en inzoomad bild på objektglaset med grafen på. De mörkt gråa zonerna är grafenflagor. Vad som kan observeras är stora hålrum mellan flagorna. Grafenet har inte bildat det homogena skikt som var önskat.

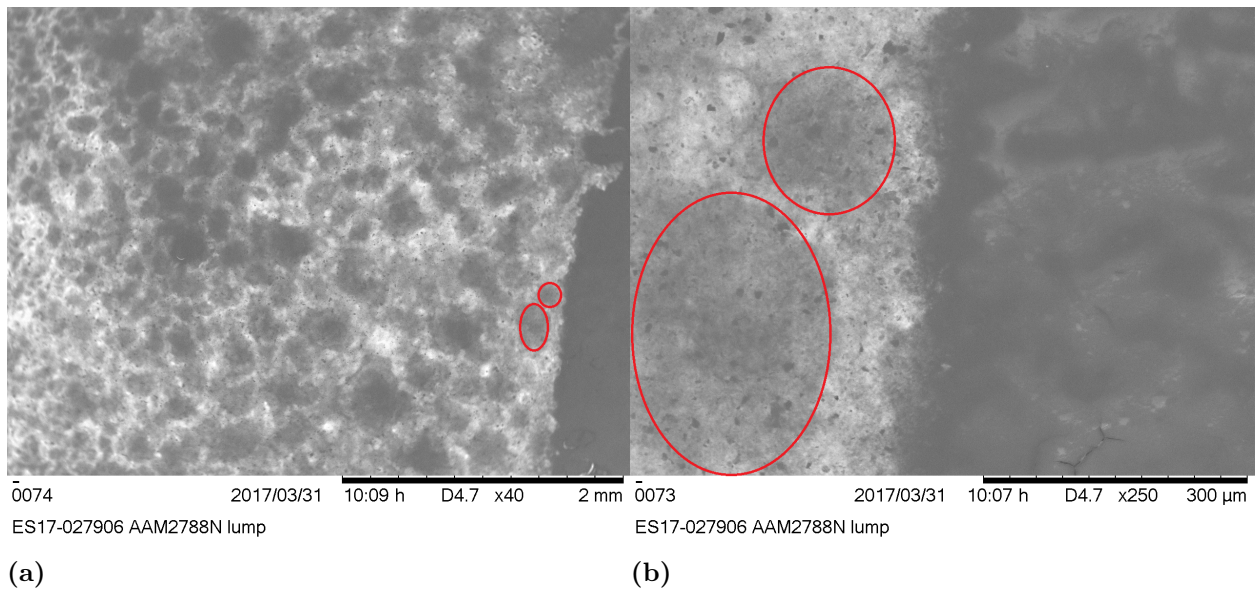


Figur 8.2: SEM-bild av grafen på objektglas. Grafen syns som mörkare, gråa flagor. 2250 gånger förstoring. Skalan 20 µm syns i grönt i nedre vänster hörn.

8.1.2 Grafenoxid

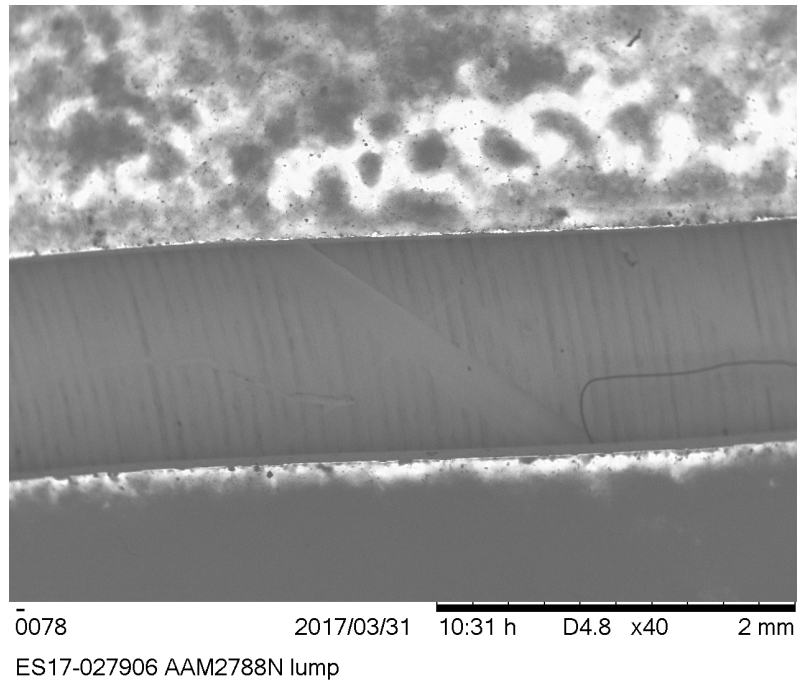
I figur 8.3 syns två förstoringar av ett prov täckt med grafenoxid. Det mörkare området till höger i båda bilderna, är råttmjuren och det ljusa området är objektglaset, båda täckta med grafenoxidmatris. Precis som för grafenmatrisen är det svårt att urskilja hur väl matrisen fördelat sig över njurvävnaden eftersom denna också är mörk i svepelektronmikroskopet. Figuren visar att grafenoxiden täcker objektglaset. Om grafenoxiden inte hade täckt objektglaset skulle glaset syns som vitt i svepelektronmikroskopet.

En annan observation är att grafenoxidmatrisen inte är homogen då de mörkare fläckarna är punkter med tjockare grafenoxidmatris. En anledning till att grafenoxiden inte blev homogent fördelad kan bero på att den torkade för långsamt när den applicerades på provet. HTX-sprayern blåste ut matrisen, så att det bildades droppar längs med hela ytan. När dropparna sedan torkade in blev det olika koncentration av grafenoxid på olika punkter, vilket resulterade i en inhomogen matris.



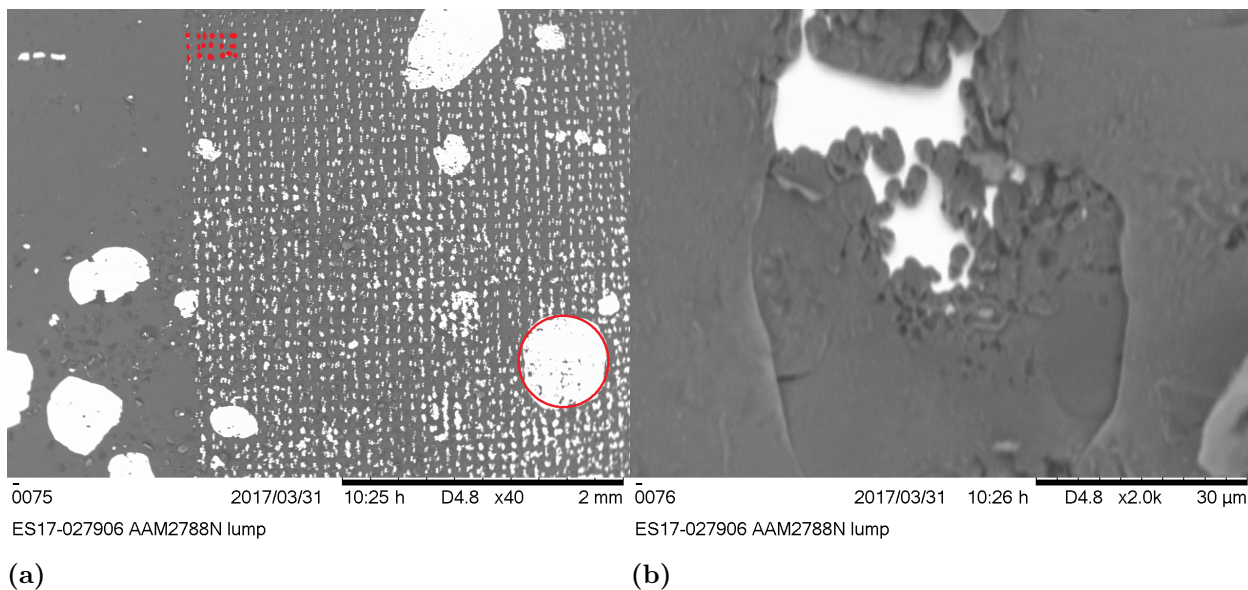
Figur 8.3: SEM-bilder av grafenoxidmatrisen applicerad på njurprovet. Njuren syns som det mörkare området i bilderna och det ljusare området visar objektglaset med grafenoxidmatris. Bild (a) har 40 gångers förstoring och bild (b) har 250 gångers förstoring. De röda cirklarna i figuren markerar två punkter med högre grafenoxidkoncentration.

Figur 8.4 visar de två grafenoxidmatriserna med olika koncentrationer på varsitt objektglas. Högst upp i figuren är grafenoxidmatrisen med koncentrationen 1,5 mg/ml och längst ner i figuren är grafenoxidmatrisen med koncentrationen 3 mg/ml. På ytan med den högre koncentrationen skiner inte glaset igenom då denna matris är tjockare. Faktumet att glaset inte skiner igenom innebär att grafenoxiden täcker hela provet. Däremot är det inte säkert att matrisen har samma tjocklek överallt.



Figur 8.4: SEM-bild av de två olika grafenoxidmatriserna. Den översta delen av bilden är den tunnare matrisen och den nedre delen är den tjockare matrisen. Den svarta delen i mitten av bilden är mellanrummet mellan de två objektglasen. 40 gånger förstoring.

Proverna med den högre koncentrationen av grafenoxidmatris brann upp när de analyserades i MALDI. Vidare analys av dessa prover kunde därmed inte genomföras. Den brända matrisen visas i figur 8.5. De små hålen i bild (a), som ligger i ett rutnät, är punkter där MALDI-lasern joniserat molekyler. Glaset syns därför som vitt i dessa punkter. Några av punkterna är markerade i rött längst upp till vänster i bilden. De stora hålen, se den stora cirkeln till höger i bilden, är områden där grafenoxidmatrisen fattat eld och bränt bort vävnaden från objektglaset. Bild (b) visar en förstoring av ett av de små rödmarkerade hålen från bild (a), där olika skikt av matris och vävnad som blir kvar efter joniseringen av provet kan ses.



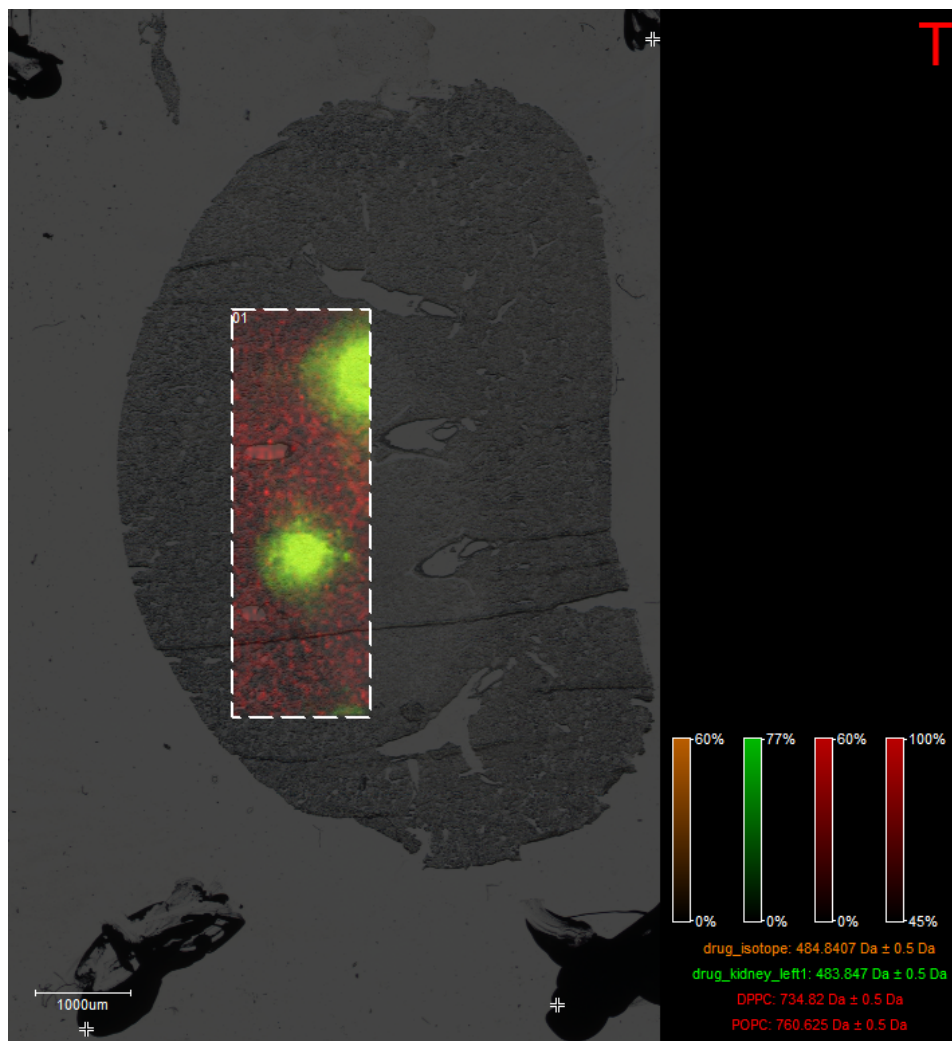
Figur 8.5: Figuren visar SEM-bilder från MALDI-körningen på ett av proverna som brann upp. Bild (a) vid 40 gånger förstoring visar punkter där laserpulsen har joniserat vävnadsprovet och där den har bränt sönder provet. Se de stora hålen markerade med röda ringar. Bild (b) vid 2000 gånger förstoring visar en punkt där lasern har joniserat provet. Se de röda punkterna i bild (a).

8.2 MALDI

Vid analys av data från MALDI analyserades prover med HCCA-matris och grafenmatris. Utifrån datan erhöles information kring hur väl läkemedelsmolekylen joniserats. Även prover med grafenoxidmatris kördes i MALDI. Då proverna med den högre koncentrationen av grafenoxid brann upp och proverna med den lägre koncentrationen brändes kunde inga tydliga resultat erhållas. Därför analyserades dessa prover inte vidare.

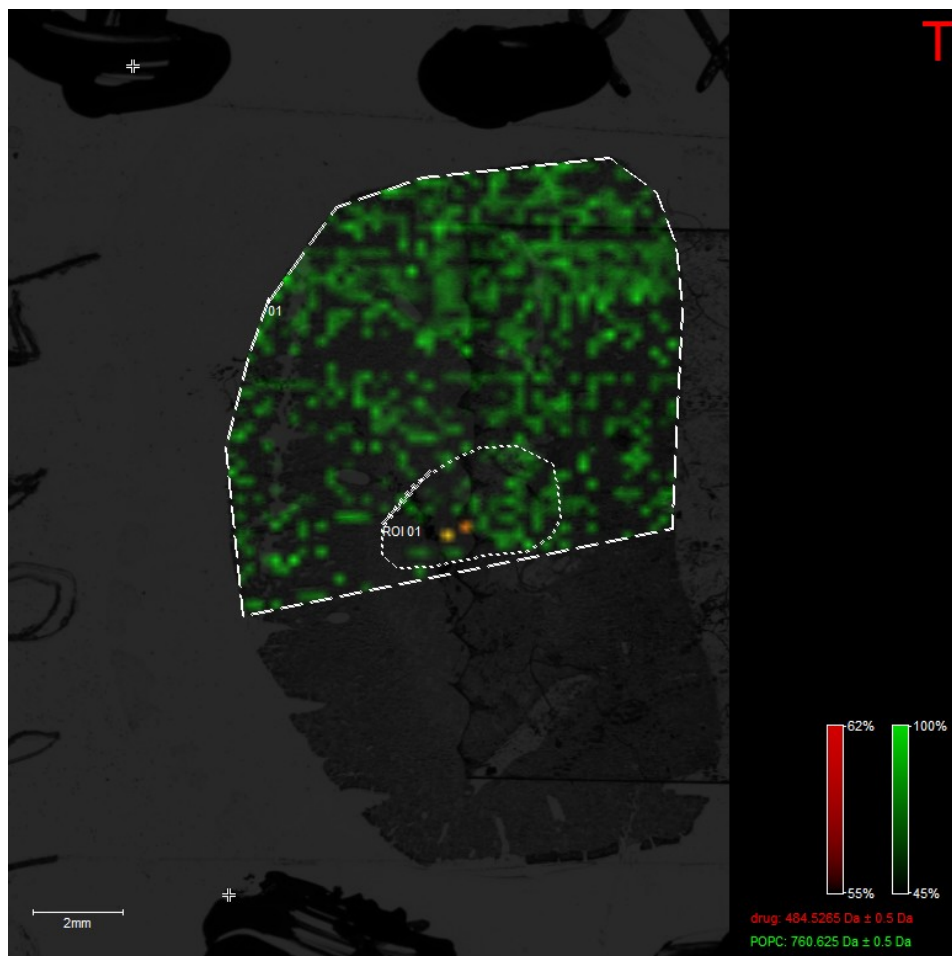
Vid analys av HCCA-matrisen valdes ett begränsat område ut, se figur 8.6. Anledningen till att detta område valdes var dels utifrån var läkemedelsdropparna hade placerats men även för att begränsa analys tiden.

De gröna områdena är de punkter där läkemedlet har detekterats. Det största och tydligaste området är droppen med högst koncentration, 10 μM . Droppen mitt i rektangeln har den näst högsta koncentrationen 5 μM och i botten av området syns en svag signal från droppen med den lägsta koncentrationen 1 μM , som mestadels har missats i analysen. Figuren visar även isotopen av läkemedlet i orange. Isotopen ligger i samma område som läkemedlet men förekommer inte i lika hög koncentration, vilket resulterar i att fläckarna blir gulgröna.



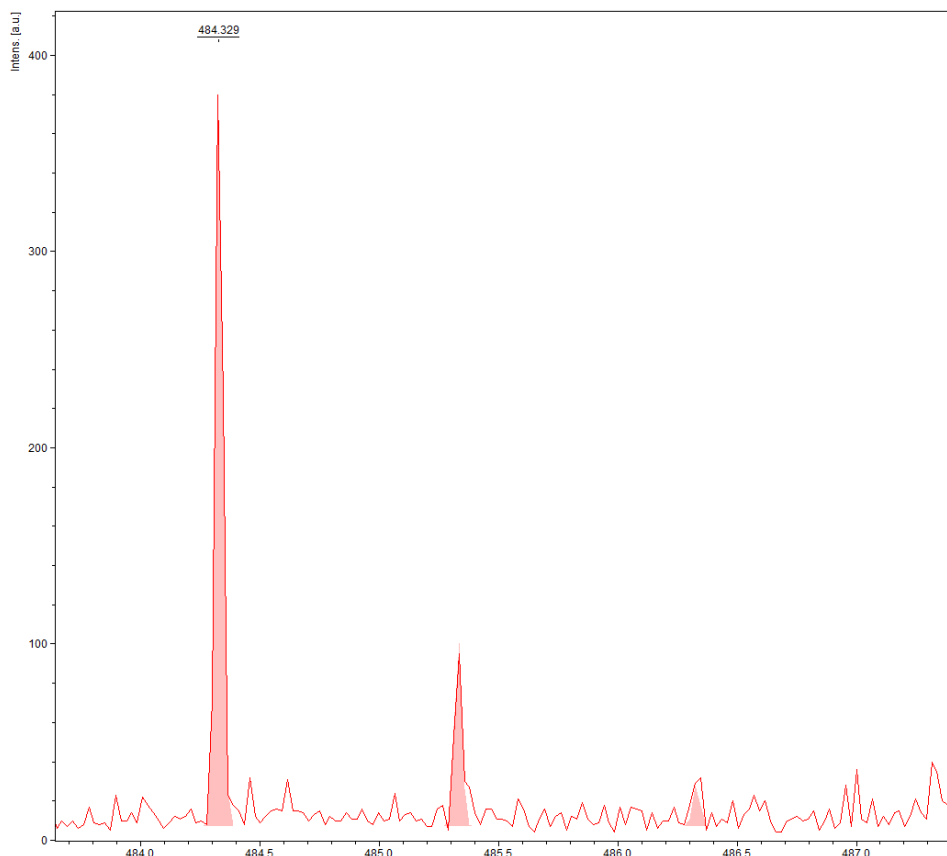
Figur 8.6: Rått njure täckt med HCCA-matris. Det streckade rektangulära området har analyserats i MALDI. De gröna fläckarna visar var läkemedlet har detekterats. Den röda bakgrundsfärgen kommer från lipiden POPC, (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [24].

Med grafen som matris utfördes samma analys som för HCCA-matrisen. Analysen genomfördes med sämre upplösning för att kunna analysera en större yta av provet. Resultatet kan ses i figur 8.7. De gröna fläckarna visar lipiden POPC och de rödaktiga fläckarna är läkemedlet. Ett mindre område analyserades för sig i efterhand i analysprogrammet *Bruker Fleximaging*. Lipiderna blev då inte lika dominerande och läkemedlet gick att urskilja tydligare i både bild, figur 8.7, och spektrum, figur 8.8.



Figur 8.7: Jonbild över rått njure täckt med grafenmatris. Det stora streckade området är det som analyserades. De gröna signalerna representerar lipiden POPC och de röda läkemedlet. Det mindre streckade området analyserades även separat i *Bruker Fleximaging* för att möjliggöra detektion av läkemedlet.

Masspektrumet i figur 8.8 kommer från analysen av det lilla streckade området i figur 8.7. Analys av halva njuren visade inte en läkemedelstopp i masspektrumet då lipidkoncentrationen var mycket högre än läkemedelskoncentrationen, men aningar om att läkemedlet hade joniserats fastställdes vid analys av det mindre området i figur 8.7. Lipidkoncentrationen var inte längre lika dominant och läkemedelstoppen syntes klart.

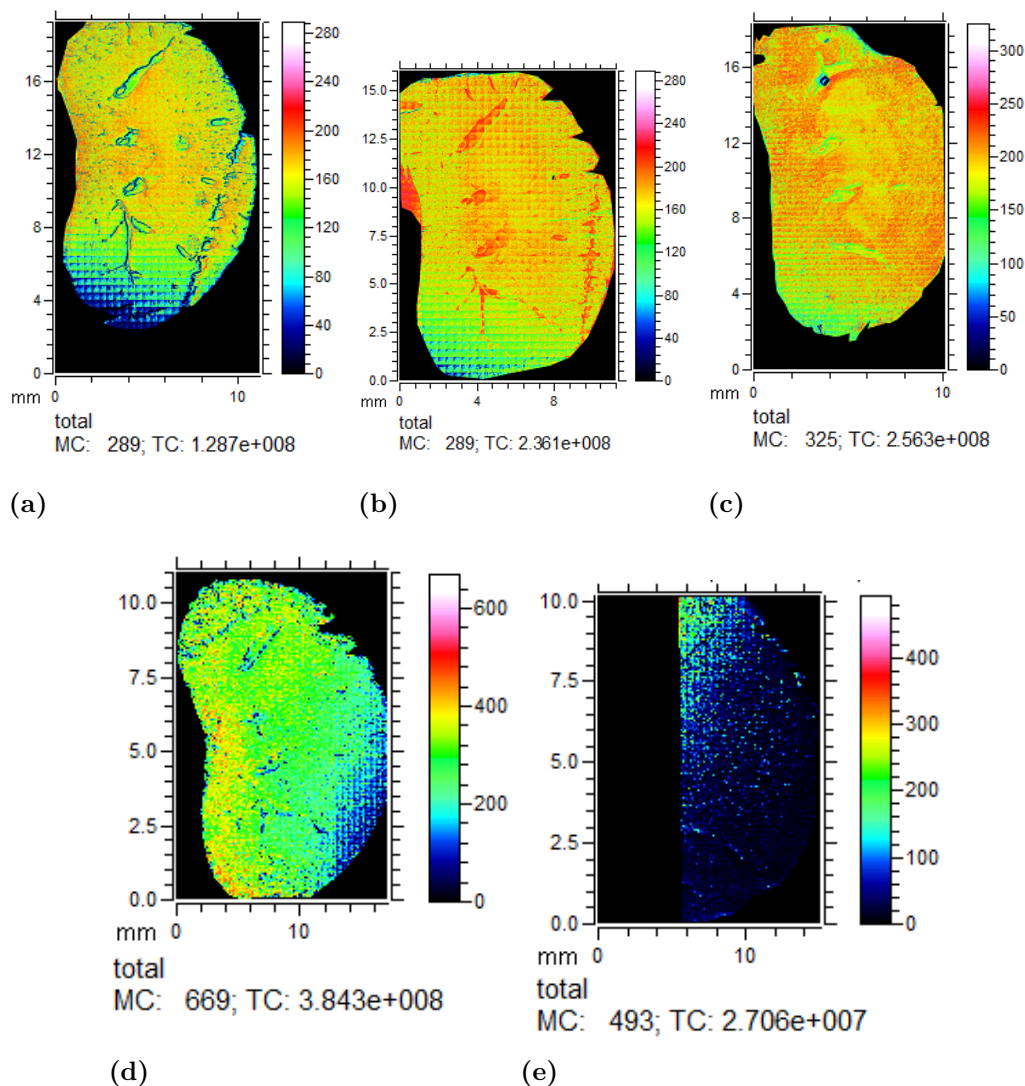


Figur 8.8: Masspektrumet kommer från det mindre området med grafenmatris. Figuren visar läkemedlet och dess isotoper och är markerade i rött. Läkemedlet utgör den högsta toppen, med massan 484,329 Da. Masspektrumet visar även bruset runt topparna.

8.3 SIMS

För att jämföra resultaten för proverna analyserade i SIMS, studerades de visuella avbildningarna av proverna. Även dess masspektrum undersöktes och statistiska analyser genomfördes. Analyserna genomfördes på alla matriser typer och utan matris.

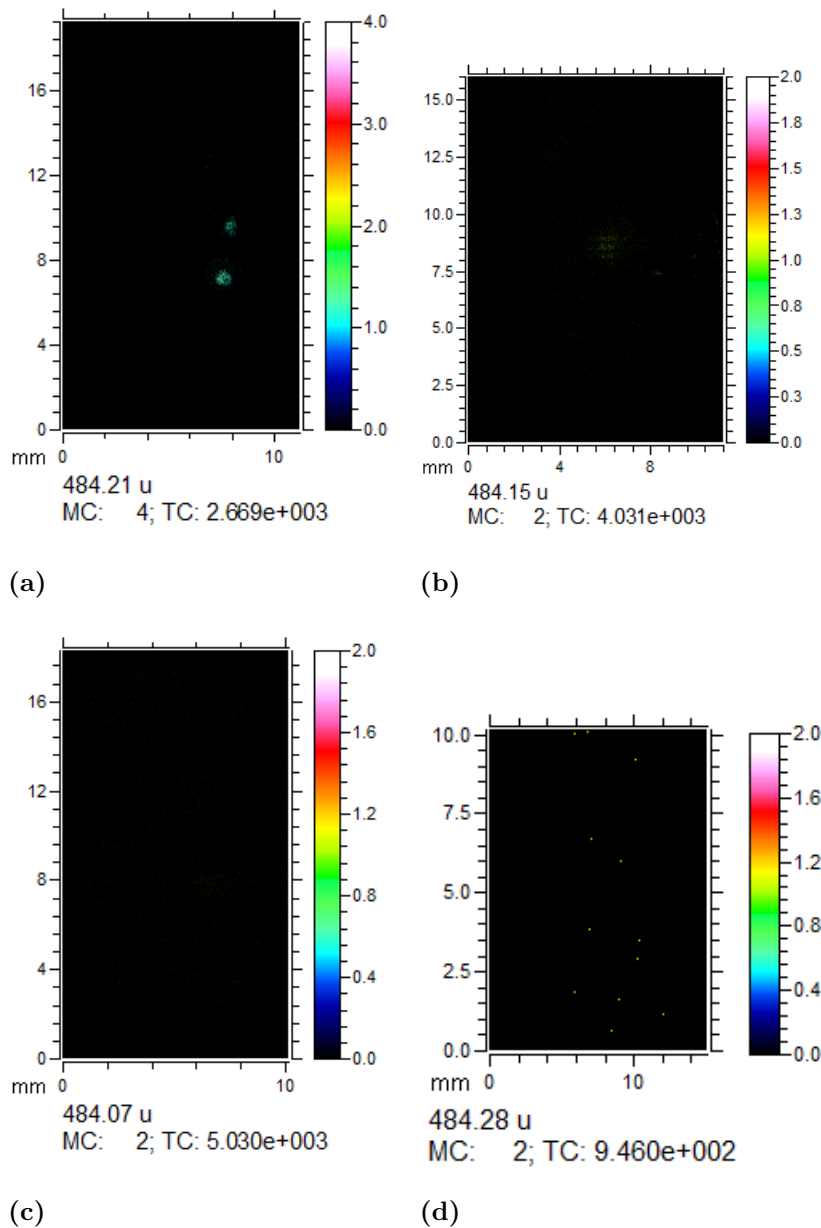
Figur 8.9 visar fem totaljonbilder för de olika matriserna. En totaljonbild innebär att den summerade intensiteten för alla molekyler ger färgskillnaderna i bilden. I en totaljonbild erhålls information om hur väl provet har joniserats. Bild (e) har ett annat utseende än de andra spektrumerna då inställningarna ändrades under körningen för att åtgärda ett tekniskt missöde. Den svarta halvan av området i bilden är från före inställningarna ändrades. Där detekterades ingenting.



Figur 8.9: De fem bilderna visar totaljonbilder för de olika matriserna. Bild (a) har ingen matris, bild (b) har grafenmatris, bild (c) har HCCA-matris, bild (d) har grafenoxidmatris och bild (e) har grafenoxidmatris där inställningarna ändrades under körningen av provet. Alla ovanstående prover förutom (d) innehåller läkemedel.

I figur 8.10 syns fyra bilder som visar vilken intensitet läkemedelsmolekylen har för de olika matriserna. I bild (a), som inte har någon matris, kan två gröna fläckar urskiljas. Dessa motsvarar troligtvis de två dropparna med högre koncentration av läkemedlet. Den tredje droppen med en lägre koncentration kan däremot inte urskiljas. I bild (b), som har grafenmatris, kan en svag grön fläck urskiljas. Denna motsvarar antagligen läkemedelsdroppen av den högre koncentrationen. Då färgen på fläckarna, i bild (a) och (b), är grön innebär det att de inte har hög intensitet, vilket ses på färgskalan bredvid bilderna. I bild (a) observeras en högre täthet på fläckarna vilket innebär att fler molekyler finns i det området. I bild (c) syns inga signaler av läkemedlet vilket innebär att få molekyler har joniserats. Att det är få molekyler som har joniserats beror sannolikt på att HCCA-matrisen var för tjock för optimal användning i SIMS. I och med att analysen av provet med grafenoxid inte lyckades, på grund av ett tekniskt missöde, kan inte en bra bild av läkemedelsdistributionen fås för

detta prov. Det går däremot att urskilja några enstaka signaler från läkemedlet i bild (d).



Figur 8.10: De fyra bilderna i figuren föreställer jonbilder där enbart läkemedelsmolekylen på råttinjuren avbildas för olika matriser. Bild (a) har ingen matris, bild (b) har grafenmatris, bild (c) har HCCA matris och bild (d) har grafenoxidmatris. Läkemedlet syns inte tydligt i dessa bilder men kan lättare detekteras i analysprogrammet.

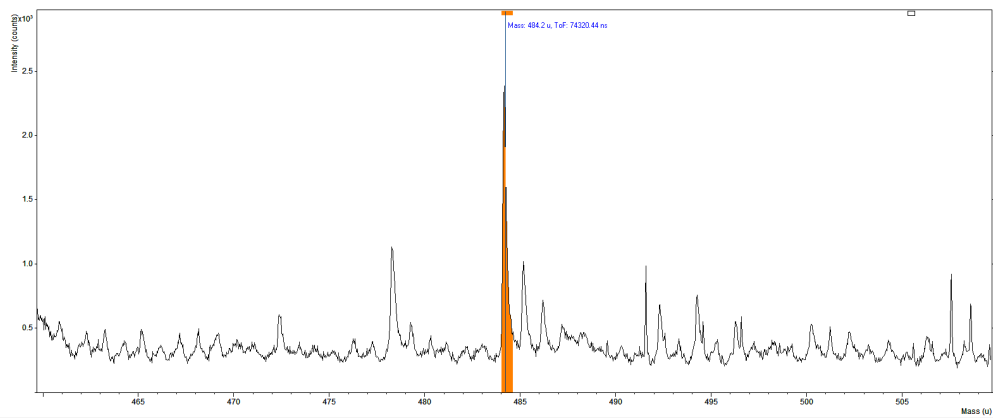
I figur 8.11 syns den markerade masstoppen för läkemedelsmolekylen i alla bilderna. Då skalorna på axlarna är samma går det att direkt jämföra dem med varandra. Intensiteten på läkemedlet för bild (a), som inte har någon matris, och bild (b), som har grafenmatris, är mycket högre än de i bild (c), som har HCCA-matris, och bild (e), som har grafenoxidmatris. Bilderna visar att undersökningen gick bättre utan matris och med grafenmatris men sämre med de andra två matriserna. En anledning till att grafenoxidmatriserna gav en lägre intensitet kan vara att koncentrationen av läkemedlet var lägre jämfört med de andra

matriserna.

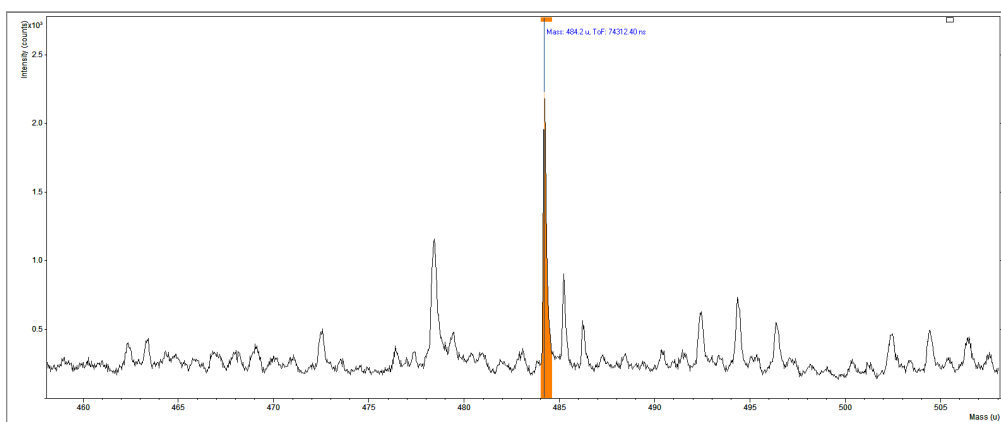
Det är även av intresse att titta på området runt läkemedelstoppen i figur 8.11 eftersom området skiljer mellan de olika matriserna. För provet med HCCA-matris, se bild (c), ser spektrumet i hela intervallet brusigt ut, det vill säga att det är svårt att skilja masstopparna från bakgrundsbruset. Läkemedelsmolekylen hade inte identifierats som en topp om inte dess massa hade varit känd och markerats i orange. HCCA fungerar därför inte bra som matris i detta intervall då det inte finns några tydliga toppar och läkemedlet inte syns som en topp.

I spektrumet från grafenoxidmatrisen utan läkemedel, se bild (d), syns många tydliga toppar till skillnad från spektrumet med grafenoxidmatris och läkemedel, se bild (e). Notera att provet med grafenoxid och läkemedel inte är representativt då inställningarna ändrades under körningen med SIMS.

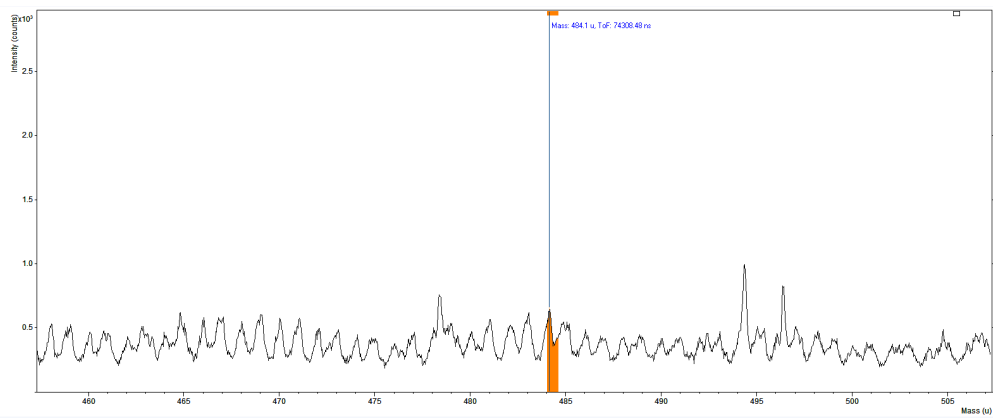
Intensiteten av topparna, i området runt 460-505 Da, ser generellt ut att vara högre för grafenoxidmatrisen utan läkemedel än för de andra matriserna, se bild (d), jämfört med bild (a), (b) och (c). De andra proven med grafenoxidmatris, ej presenterade här, fick spektrum liknande det i bild (d). Därför kan slutsatser dras om att grafenoxid är en matris som ökar intensiteten för ämnen i detta intervall. Detta kan tänkas bero på att det är färre större molekyler som fragmenteras och de kan därför detekteras.



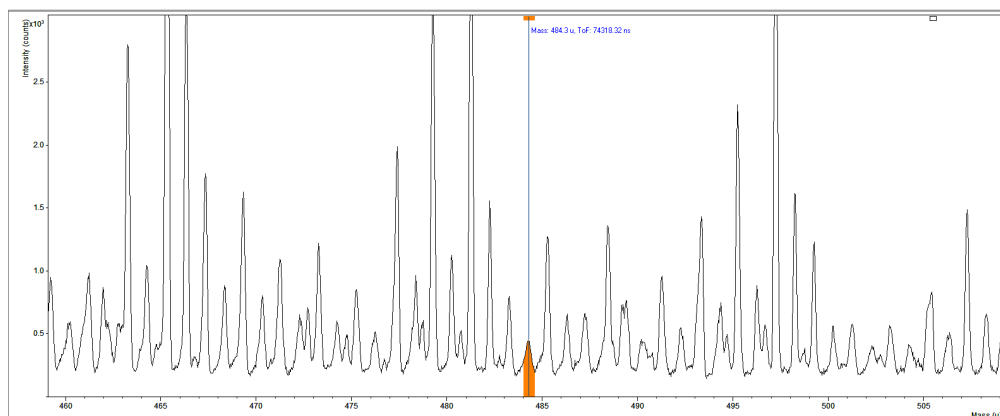
(a)



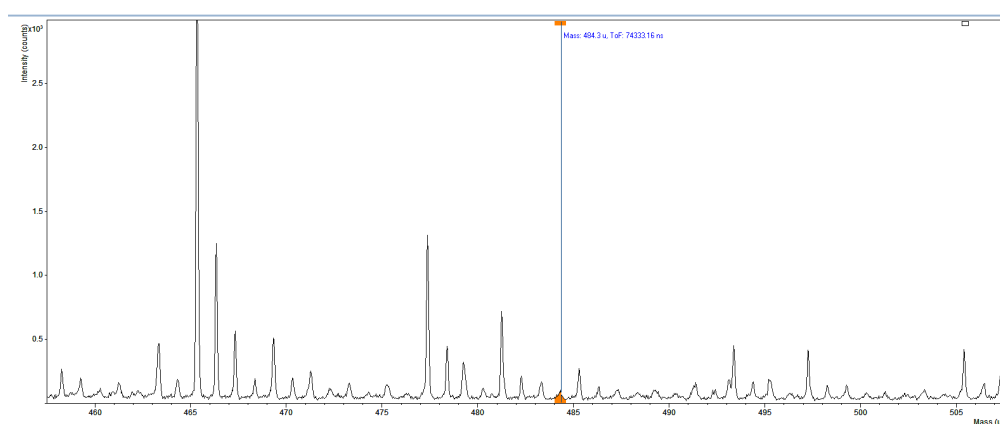
(b)



(c)



(d)

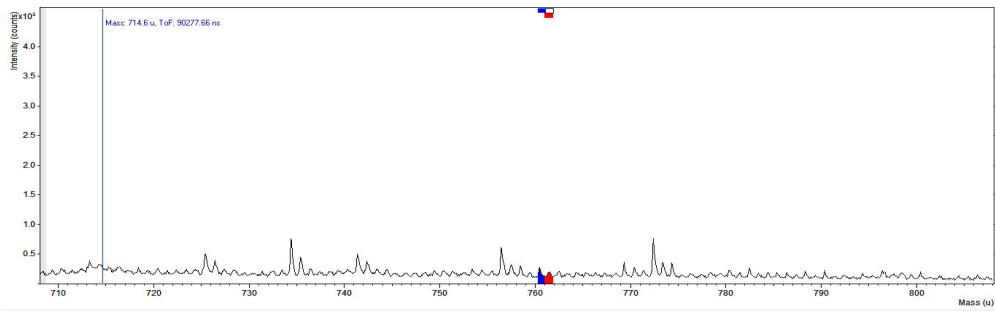


(e)

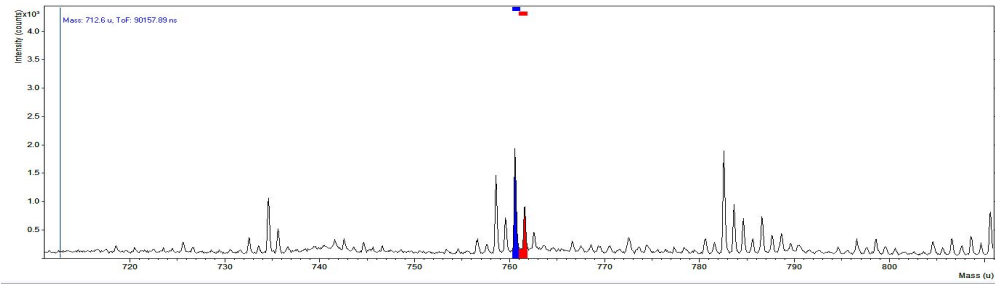
Figur 8.11: Figuren visar masspektra i skalan 460-505 Da där skalorna är samma. Bild (a), (b), (c) och (e) visar resultatet för olika matriser med läkemedel där bild (e) har en lägre koncentration av läkemedlet. Bild (a) har ingen matris, bild (b) har grafenmatris, bild (c) har HCCA-matris och bild (d) och (e) har grafenoxidmatris. Bild (d) har inget läkemedel men finns med för jämförelse av omkringliggande spektrum.

Vid jämförelse av högre intervall, se figur 8.12, observeras toppen med massan 760,6 Da samt toppen med massa 761,6 Da. De har högre intensitet vid användande av grafenmatris, se bild (b) och (c), än i fallet utan matris, se bild (a), och HCCA-matris, se bild (d). När grafenoxidmatrisen betraktas syns däremot en lägre intensitet för toppen 761,6 Da men högre intensitet för toppen 760,6 Da, se bild (e). Trots att proven bör vara likvärdiga då det är samma vävnad som undersöks, joniserar matriserna olika molekyler med varierande effektivitet, vilket resulterar i att intensiteten hos molekylerna varierar beroende på matris. En faktor som skiljer proven åt är vilka ämnen från matrisen som fragmenteras och detekteras. För matriserna med grafen och grafenoxid bryts matriserna ner till kolisotoper eftersom matriserna till stor del består av kol. Dessa kolisotoper finns vanligtvis i storleksordningen 1-100 Da och borde därför inte påverka intervallet som studeras här.

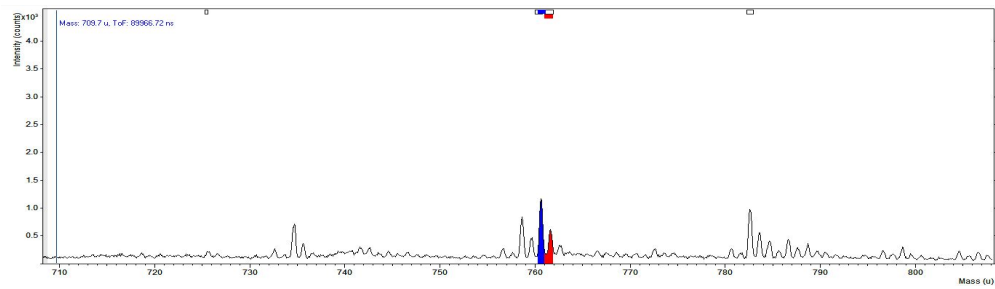
I figur 8.12 har bilderna (b), (c) och (e) högre masstoppar och lägre bakgrundsbrus. Det är därför möjligt att grafenmatriser och grafenoxidmatriser är bättre på att jonisera molekyler med högre massa.



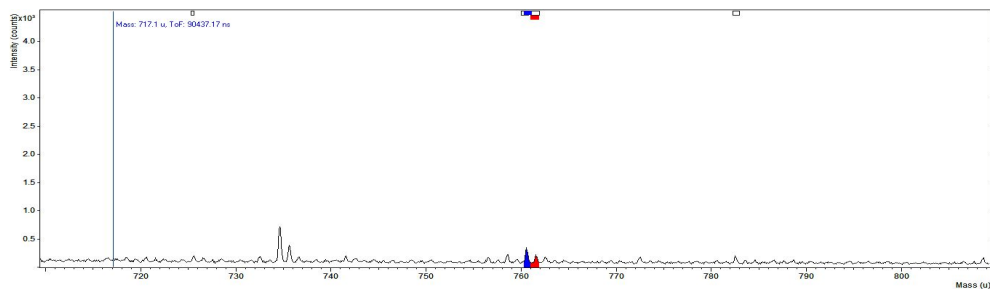
(a)



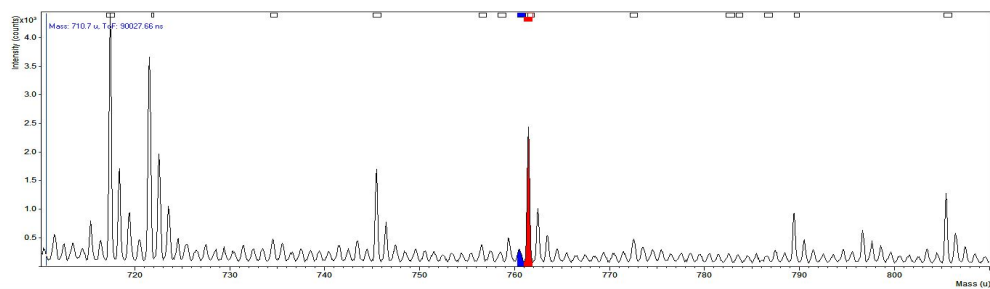
(b)



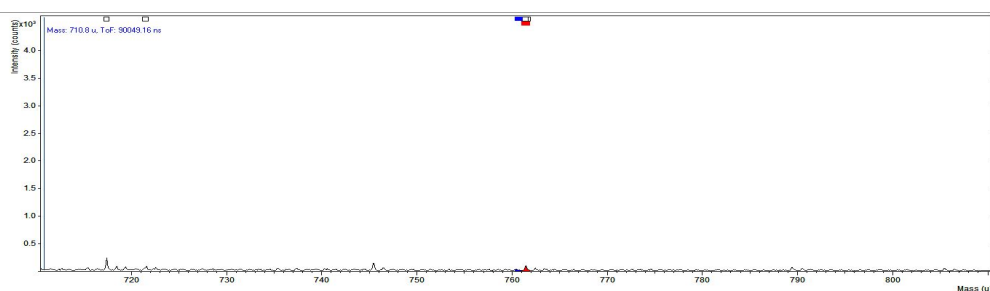
(c)



(d)



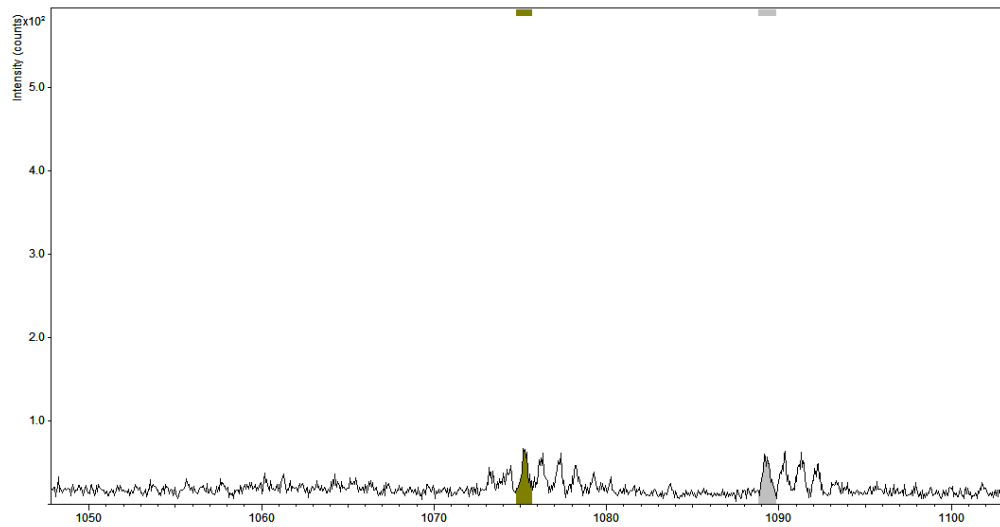
(e)



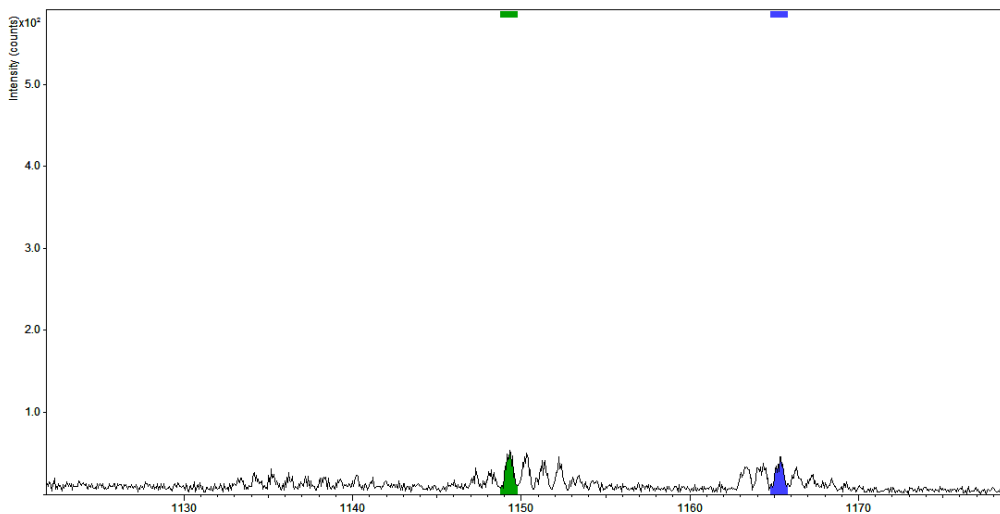
(f)

Figur 8.12: Figuren visar masspektrum där toppen för 760,6 Da är markerad i blått och toppen för 761,6 Da är markerad i rött. Proverna i bild (a), (c), (d) och (f) innehåller läkemedel och bild (b) och (e) innehåller inte något läkemedel. Bild (a) har ingen matris, bild (b) och (c) har grafenmatris, bild (d) har HCCA-matris, och bild (e) och (f) har grafenoxidmatris. Alla bilderna har samma skala på axlarna.

I masspektrumet för vävnadsprovet med grafenoxidmatris kan fyra kluster av toppar hittas vid massor på 1070-1095 Da och 1145-1170 Da, se figur 8.13. Topparna har inte en hög intensitet men utmärker sig från det omkringliggande bruset. De kan inte hittas i de masspektra som kommer från proverna med de andra matriserna där de enbart åskådliggörs som bakgrundsbrus. Det är svårt att avgöra vad de här topparna motsvarar för ämnen. De skulle kunna vara någon form av joner från stereolipider eller triacylglyceroler. Det faktum att grafenoxid ger toppar i detta intervall innebär att grafenoxid kan möjliggöra analys av ämnen i högre intervall än andra matriser.



(a)



(b)

Figur 8.13: Figuren visar två masspektra från SIMS-undersökningar med grafenoxid-matris. Bild (a) är i intervallet 1070-1095 Da och bild (b) är över intervallet 1145-1175 Da.

8.3.1 Statistisk analys med ANOVA och LSD

I statistisk analys med ANOVA jämförs masstopparnas intensitet med hänsyn till vilken sorts matris som används samt vilken topp det gäller. Tabellerna från ANOVA finns i bilaga B. Samtliga ANOVA-undersökningar visar att det finns en statistiskt signifikant skillnad mellan matriserna samt mellan masstopparna både på 95 procents och 99 procents konfidensgrad.

Att det är skillnad mellan topparna är naturligt då de olika topparnas intensitet skiljer sig åt inom provet beroende på vävnadsinnehållet. En bekräftad skillnad mellan de olika matriserna är däremot inte lika självklar då undersökningen syftar till att undersöka om grafen och grafenoxid effektivt kan användas som matriser. ANOVA visar dock enbart att det finns en viss skillnad mellan matriserna. Undersökningen indikerar inte vilka matriser

som skiljer sig åt eller vilka som är bättre eller sämre än andra.

För att undersöka vilka av matriserna som skiljer sig åt används den statistiska metoden Least significant difference, LSD. I LSD jämförs intensitetens medelvärde för två prov i taget. Om absolutbeloppet av differensen överstiger LSD-värdet för aktuell konfidensgrad är det en signifikant skillnad mellan proven. En positiv differens tyder på att det första provet har högre intensitet och en negativ differens tyder på motsatsen. En högre intensitet är i detta fall eftersträvansvärt då det innebär att signalen som erhålls är tydligare. I tabellerna 8.1-8.4 presenteras medelvärdena för de olika proven för respektive masslista.

För masslistan som skapades utifrån proven som hade grafenmatris erhöles med en konfidensgrad på 95% LSD-värdet 922,57 och med en konfidensgrad på 99% LSD-värdet 1212,52. Då differenserna mellan medelvärdena för proven, se tabell 8.1, jämförs med LSD-värdena erhålls en del signifikanta resultat.

Provet *Grafenoxid med läkemedel 1* är signifikant sämre, det vill säga har lägre intensitet, än alla andra prov. Den 99-procentiga konfidensgraden uppfylls vid jämförelserna med alla prov utom *Ingen matris med läkemedel 1* vilket också har ett relativt lågt medelvärde och därför inte skiljer sig lika mycket från provet *Grafenoxid med läkemedel 1* som de andra. Även *Ingen matris med läkemedel 1* är signifikant sämre till 99% än alla andra prov, förutom *HCCA med läkemedel* och *Grafenoxid med läkemedel 1*.

HCCA med läkemedel är signifikant sämre än tre av fyra prov med grafenmatriser. Vid en 99-procentig konfidensgrad är det sämre än *Grafen 1* och vid en 95-procentig konfidensgrad är det sämre än *Grafen med läkemedel 1* och *Grafen med läkemedel 2*. Det kvarvarande grafenprovet, *Grafen 2*, har något lägre medelvärde på intensiteten än de övriga, vilket kan ses i tabell 8.1, och är även signifikant sämre till 95 procents konfidensgrad än *Grafen 1*.

Tabell 8.1: Medelvärden för topparna i masslistan skapad utifrån prover med grafen som matris.

Prov	Medelvärde
HCCA med läkemedel	2066,66
Grafen 1	3727,25
Grafen med läkemedel 1	3075,11
Grafen 2	2516,14
Grafen med läkemedel 2	3221,30
Ingen matris med läkemedel 1	1300,38
Ingen matris med läkemedel 2	2887,23
Grafenoxid 1	2838,81
Grafenoxid med läkemedel 2	2616,04
Grafenoxid 2	2516,08
Grafenoxid med läkemedel 1	321,08

För masslistan som skapades utifrån grafenoxidproven är LSD-värdena 2710,12 och 3561,87 för 95 procents respektive 99 procents konfidensgrad. Medelvärdena för respektive prov kan ses i tabell 8.2.

För denna masslista är resultaten tydliga. Tre av de fyra grafenoxidproven, *Grafenoxid 1*, *Grafenoxid med läkemedel 2* samt *Grafenoxid 2*, är signifikant bättre till en 99-procentig konfidensgrad än alla andra prov, inklusive det sista grafenoxidprovet *Grafenoxid med läkemedel 1*. Mellan övriga prov finns det inga signifikanta skillnader.

Tabell 8.2: Medelvärden för topparna i masslistan skapad utifrån prover med grafenoxid som matris.

Prov	Medelvärde
HCCA med läkemedel	1757,06
Grafen 1	1677,61
Grafen med läkemedel 1	1652,71
Grafen 2	1538,06
Grafen med läkemedel 2	1773,42
Ingen matris med läkemedel 1	1049,21
Ingen matris med läkemedel 2	2220,91
Grafenoxid 1	16179,91
Grafenoxid med läkemedel 2	10707,60
Grafenoxid 2	12038,91
Grafenoxid med läkemedel 1	1130,32

För masslistan som skapades utifrån HCCA-provet är LSD-värdena 3267,77 och 4372,12 för 95 procent respektive 99 procent konfidensgrad. Medelvärdena för respektive prov kan ses i tabell 8.3.

Provet *Grafenoxid med läkemedel 1* är signifikant sämre än majoriteten av övriga prov. Det är signifikant sämre med 95-procentig konfidensgrad än *HCCA med läkemedel*, *Grafen med läkemedel 1*, *Grafen 2*, *Ingen matris med läkemedel 2*, *Grafenoxid 1* och *Grafenoxid med läkemedel 2*. Det är signifikant sämre med 99-procentig konfidensgrad än *Grafen 1* och *Grafen med läkemedel 2*. Övriga prov är inte signifikant bättre eller sämre än något annat.

Tabell 8.3: Medelvärden för topparna i masslistan skapad utifrån prover med HCCA som matris.

Prov	Medelvärde
HCCA med läkemedel	4187,49
Grafen 1	5072,20
Grafen med läkemedel 1	4667,54
Grafen 2	3803,80
Grafen med läkemedel 2	4890,66
Ingen matris med läkemedel 1	2532,22
Ingen matris med läkemedel 2	5689,45
Grafenoxid 1	3810,29
Grafenoxid med läkemedel 2	3671,70
Grafenoxid 2	3195,50
Grafenoxid med läkemedel 1	436,61

För masslistan som skapades utifrån proverna utan matris är LSD-värdena 2016,18 och 2664,82 för 95 procents respektive 99 procents konfidensgrad. Medelvärdena för respektive prov kan ses i tabell 8.4.

Även för denna masslista är *Grafenoxid med läkemedel 1* sämre än många övriga prov. Provet är signifikant sämre med 95-procentig konfidensgrad än *HCCA med läkemedel*, *Grafen med läkemedel 1*, *Grafen med läkemedel 2*, *Grafenoxid 1*, *Grafenoxid medläkemedel 2* och *Grafenoxid 2*. Signifikant sämre till en 99-procentig konfidensgrad är *Grafen 1* och *Ingen matris med läkemedel 2*. Provet *Ingen matris med läkemedel 2* är signifikant bättre med 95 procents konfidensgrad än *Grafen 2*, *Ingen matris med läkemedel 1* och *Grafenoxid 2*.

Tabell 8.4: Medelvärden för topparna i masslistan skapad utifrån prover utan matris.

Prov	Medelvärde
HCCA med läkemedel	2733,73
Grafen 1	3122,87
Grafen med läkemedel 1	2717,05
Grafen 2	2318,79
Grafen med läkemedel 2	2980,67
Ingen matris med läkemedel 1	2043,49
Ingen matris med läkemedel 2	4700,14
Grafenoxid 1	2944,58
Grafenoxid med läkemedel 2	2861,46
Grafenoxid 2	2389,52
Grafenoxid med läkemedel 1	339,82

Efter LSD-undersökningen står det klart att *Grafenoxid med läkemedel 1* är det i allmänhet sämsta provet vilket även kan anas i figur 8.9 (e). Orsaken till det dåliga resultatet är troligen inte att det är just grafenoxid som använts, då de andra proven med grafenoxid genomgående har betydligt bättre resultat. Snarare beror det på tekniska fel under avläsningen.

Det tydligaste resultatet är att grafenoxid som matris är bättre än alla andra matriser när masslistan baserad på grafenoxidproven används. Resultaten från de andra listorna visar dock generellt sett liten skillnad mellan grafenoxid och de andra matristyperna. Detta innebär att grafenoxid håller ungefär samma standard som de andra matriserna. När det gäller vissa toppar, de som finns med i grafenoxidlistan, är grafenoxid som matris signifikant bättre. Topparna som framhävs med grafenoxid är intressanta för vidare undersökning för att ta reda på vad det finns för samband mellan dem och varför just de syns tydligare vid användandet av grafenoxidmatris.

Vilka toppar som finns med i de olika listorna beror på vilka som var tydliga för respektive matristyp och är i sig ett resultat. Antalet toppar i listan med grafen var 25, med grafenoxid 27, med HCCA 6 och utan matris 11. Skillnaden i antalet toppar tyder på att grafen- och grafenoxidmatriser gav tydligare resultat i det valda intervallet 500-900 Da medan HCCA gav väldigt lite resultat. Det faktum att HCCA-provet var sämre än både grafen och grafenoxid på deras respektive listor är därför inte särskilt förvånande då det fanns få tydliga toppar.

8.3.2 Statistisk analys med PCA

Vid en PCA-utvärdering jämförs de olika matriserna med en komplex analys av masstopparnas intensitet, erhållna från SIMS-körningarna. För varje vävnadsprov har intensiteten för 151 masstoppar samlats och varje prov har grupperats efter typ av matris. Totalt utvärderas elva prover. Grupperingarna är enkla beteckningar för varje typ matris som underlättar vid bildanalys. De elva olika proven presenteras i bilaga A.1 för mer detaljerad information. Mjukvaran *SIMCA* användes för att få fram bilderna i figurerna 8.14 och 8.15.

Bild (a) i figur 8.14 visar en scoreplot över en statistisk PCA gjord i *SIMCA*. Punkterna i bilden representerar de olika undersökningarna som gjordes i SIMS. Färgmarkeringarna i bild (a) kommer från olika grupperingar som skapades i programmet och är baserade på de olika matriserna. Gröna punkter är grafenmatrismätningar. Blå punkter är grafenoxidmatrismätningar. Den röda punkten är HCCA-matrismätningen och de gula punkterna är mätningar utan matris.

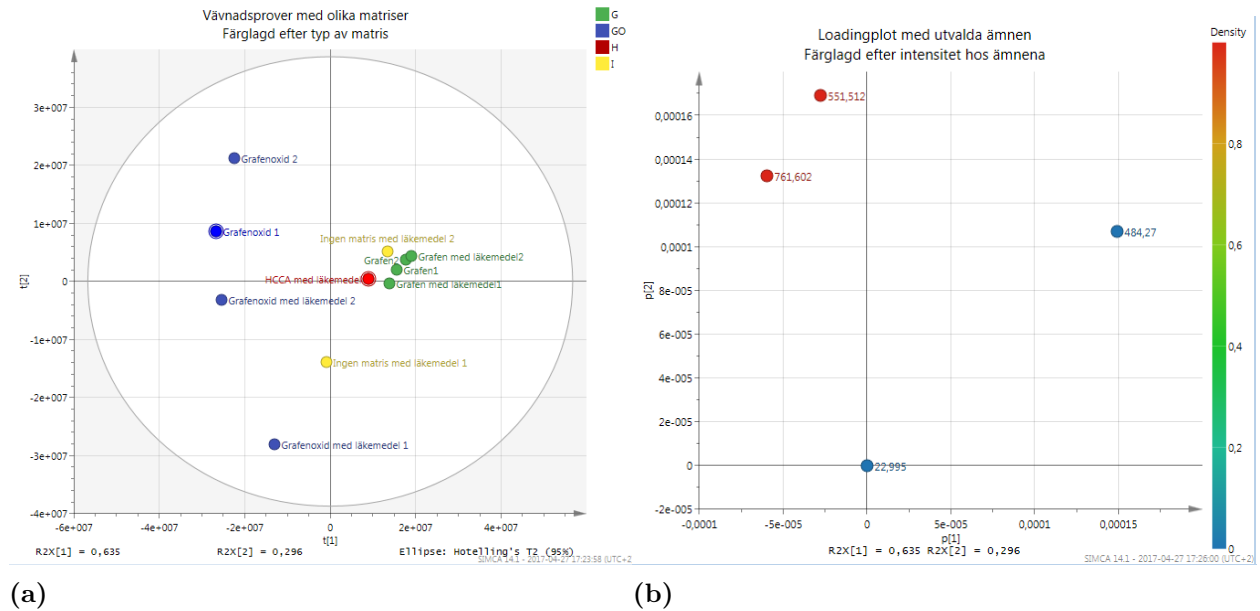
Bild (a) visar att de mätningar gjorda på prover med grafenmatris liknar varandra. De placeras därför i ett kluster i scoreplotten. Resultaten från grafenoxidmatriserna visar större varians mellan matriserna i denna gruppering. De är därför mer utspridda i scoreplotten. Det är dock värt att nämna att undersökningen av grafenoxidmatrisen längst ner i bilden, *Grafenoxid med läkemedel 1* misslyckades och enbart halva njuren analyserades korrekt. Om denna punkt exkluderas i utvärderingen placeras alla grafenoxidmatriser i samma kvadrant, vilket indikerar att de har viss likhet.

Provet med HCCA-matris ligger närmre grafenmatrisklustret vilket indikerar likvärdiga resultat. Det stämmer överens med resultaten i tre av fyra LSD-test, tabellerna 8.2, 8.3 och 8.4. Proverna utan matris ligger långt ifrån varandra och visar därför inte på att de är lika. *Ingen matris med läkemedel 2* observeras ligga nära grafenmatrismätningarna, vilket indikerar att denna typ av matris ger likvärdiga resultat. Detta är rimligt då grafenmatrisen enbart består av små grafenflagor, se figur 8.1, vitt utspridda och därför borde likna prover utan matris i hög grad. *Ingen matris med läkemedel 1* ligger nära mittstreckets, vilket indikerar att provet inte visar samhörighet eller olikhet med något av de andra proverna.

Figur 8.14 visar även en visuellt praktisk korrelation då ämnen i loadingploten, figur 8.14 (b), lägger sig åt samma håll som matriserna befinner sig i scoreplotten (a) [25]. Bild 8.14 (b) visar fyra utvalda molekyler. Se figur A.2 i bilaga A för fullständig loadingplot. Läkemedelsmolekylen på 484,27 Da, POPC på 761,602 Da [24], diacylglycerol på 551,512 Da [26] och Na^+ på 22,995 Da. Läkemedelsmolekylen ligger till höger i figuren, åt samma håll som grafenmatrismätningarna gör. Detta indikerar att grafenmatriserna joniserar läkemedelsmolekylen bättre än både prover utan matris och HCCA-matris, vilket konstateras i figur 8.11 (b). Det bör noteras att prover med grafenoxidmatris hade lägre koncentration av läkemedlet än de andra proverna. Det är därför inte konstigt att läkemedelsmolekylen placeras till höger i loadingplotten.

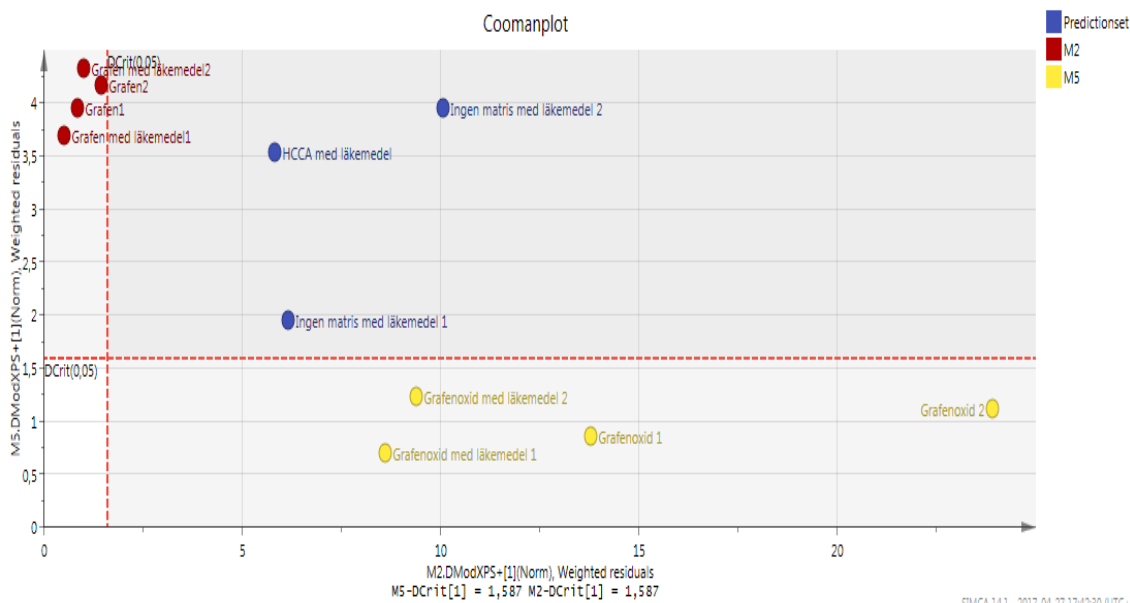
Läkemedelsmolekylen existerar inte i alla vävnadsprover, men det påverkar inte resultatet för PCA-undersökningen, vilket förklaras i bilaga A, se figur A.3. Däremot kan POPC och diacylglycerol jämföras, eftersom de har högre intensitet och större inverkan på modellen. I

figuren ligger POPC och diacylglycerol till vänster, där grafenoxidundersökningarna ligger i scoreplotten, vilket indikerar att grafenoxidmatriser lyfter fram dessa toppar bättre än de andra matriserna. Detta fenomen konstateras i figur 8.12 (e). Na^+ valdes ut eftersom jonen finns i nästan samma intensitet hos alla matriser och resulterar i att det placeras i origo i figuren.



Figur 8.14: Bild (a) visar en scoreplot över statistisk PCA. Proverna har grupperats efter typ av matris, där grön färg representerar prov med grafenmatris, blå färg är prover med grafenoxidmatris, röd färg är prov med HCCA-matris och gul färg är prover utan matris. Bild (b) visar olika massor till utvalda ämnen. 22 Da är natrium, 484,27 Da är läkemedelsmolekylen, 761 Da är POPC och 551 Da är diacylglycerol. Figuren jämför vilken molekyl/atom som korrelerar bäst till en typ av matris.

Figur 8.15 visar en Coomansplot som separerar de olika matriserna beroende på två gruppindelningar [25]. Grupp ett, de röda punkterna, består av grafenmatrismätningar och grupp två, de gula punkterna, är grafenoxidmatrismätningar. Grupperna lägger ut varsin röd linje, en tillhörighetsindikering som bygger axlarna i figuren. Om en mätning ligger innanför de röda linjerna innebär det att mätningen liknar mätningarna i gruppen. Grafenmätningarna är lika varandra vilket medför att de alla ligger nära varandra innanför den röda linjen. En större varians inom grafenoxidmatrismätningarna observeras, eftersom mätningarna är mer utspridda. Alla mätningar är dock innanför den röda linjen vilket tyder på viss likhet. En annan observation är att det är stor skillnad mellan grafenmätningarna och grafenoxidmätningarna eftersom de olika grupperna är långt ifrån origo.



Figur 8.15: Figuren visar en Coomansplot över PCA. Figuren visar tydligare uppdelningen av de olika grupperna. Grupp ett är de prover med grafenmatris. Grupp två är de prover med grafenoxidmatris.

8.4 Sammanfattande diskussion

Vid analysen med MALDI var HCCA som matris överlägsen grafen. Det var lättare att upptäcka läkemedlet både genom att studera masspektrumet och avbildningarna. En trolig orsak till detta var att grafenmatrisen blev för tunn och grafenet inte täckte hela provet. Då MALDI kräver en matris för att jonisera provet har antagligen inte så många molekyler joniserats och därför inte kunnat detekteras. Det faktum att grafenoxidmatrisen brann upp gör att den inte kan inkluderas för jämförelse, vilket är oturligt då dess högre koncentration hade kunnat lämpa sig bättre för MALDI. Varför grafenoxidmatriserna brann upp är oklart, men det skulle kunna bero på att laserstyrkan var högre än vad provet klarade av. En lägre intensitet på lasern kan ha varit att föredra. Även innehållet av syre i grafenoxiden kan ha varit en bidragande faktor till att provet brändes.

Ett bättre resultat inom masspektrometri utmärks av att det blir lättare att upptäcka masstoppar av intresse i ett masspektrum. Detta kan ske genom att intensiteten på topparna blir högre och/eller en minskning av bakgrundstopparnas intensitet. I fallen med grafen- samt grafenoxidmatriser vid undersökningen med SIMS verkar det främst röra sig om en höjning av topparnas intensitet. Figurerna 8.11 och 8.12 tyder på detta.

Den statistiska undersökningen med LSD visar också på en höjning i intensiteten, främst när grafenoxid används, men bara när det gäller vissa toppar. Detta tyder på att grafenoxid inte ger provernas masstoppar allmänt högre intensitet, det finns något slags urval eller begränsning. Vid användandet av grafenmatris ges liknande resultat, dock inte lika tydliga. I figur 8.12 ses hur grafen och grafenoxid har givit en högre intensitet på olika toppar. Att det finns en skillnad mellan resultatet som ges av proverna med grafen respektive grafenoxid styrks även av resultatet i Coomansplotten, se figur 8.15.

Generellt sett verkar grafen och grafenoxid som matriser ge fler tydliga toppar än HCCA eller ingen matris för de ämnen som är högre upp i masspektrumet, från ca 500 Da. Exempel på detta ges i PCA-utvärderingen där grafenoxid tycks lyfta fram POPC och diacylglycerol, två tyngre molekyler. Det är i de högre områdena i masspektrumet som skillnaden mellan matriserna märks som tydligast, eftersom det är möjligt att detektera toppar med grafenoxid som med övriga matriser inte syns. Ett exempel på det är topparna som kan ses i figur 8.13. Att med SIMS klara av att detektera molekyler med högre massa är önskvärt då detta vanligtvis är svårt med denna analysmetod. Grafens förmåga att öka intensiteten för tyngre molekylers toppar är därför intressant och bör utforskas vidare.

Olika sorters grafenmatriser vid användandet av SIMS är lovande för framtida användning men kräver vidare studier. Först och främst skulle metoden för att använda grafen som matris på vävnader behöva optimeras. Huruvida det fungerar bäst att använda grafen eller grafenoxid, lämpliga koncentrationer på dessa samt appliceringssätt skulle behöva fastställas. I denna undersökning användes olika koncentrationer av grafen och grafenoxid och även olika appliceringssätt, detta på grund av ämnens olika löslighet. Skillnaderna gör det svårt att göra en rättvis jämförelse mellan grafen och grafenoxid. Koncentrationskillnaderna skulle kunna vara en orsak till att grafen inte gav lika tydliga resultat som grafenoxid. Användandet av HTX-sprayer verkar vara en bra appliceringsmetod men kräver optimering av inställningar för att få ett så homogent och optimalt tjockt matrislager som möjligt.

Vidare behövs det mer ingående studier i vad effekten av grafenmatriser är i förhållande till andra matriser. Om det är så som undersökningen tyder på, att bara vissa toppar förbättras, alternativt förbättras mer än andra, skulle det vara intressant att undersöka vilka dessa toppar är. Det vore även av intresse att undersöka om det finns samband mellan dem och varför just de påverkas.

9 Slutsats

Grafen och grafenoxid har båda potential att användas som matriser. Främst grafenoxid ger förbättrade resultat när det gäller vissa ämnen. Vidare studier krävs för att komma underfund med vad som utmärker dessa ämnen och varför de påverkas som de gör. För att effektivt kunna använda grafen eller grafenoxid som matriser krävs även optimering av matrisernas utformande och applicering.

10 Referenser

- [1] R. C. King, P. K. Mulligan, and W. D. Stansfield, *A Dictionary of Genetics*, vol. 8, 2013.
- [2] B. Prideaux and M. Stoeckli, “Mass spectrometry imaging for drug distribution studies,” 2012.
- [3] A. Bodzon-Kulakowska and P. Suder, “Imaging mass spectrometry: Instrumentation, applications, and combination with other visualization techniques,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 35, no. 1, pp. 147–169, 2016.
- [4] Mikayé, “MALDI.svg,” 2013.
- [5] J. Hanrieder, P. Malmberg, and A. G. Ewing, “Spatial neuroproteomics using imaging mass spectrometry,” *BBA - Proteins and Proteomics*, vol. 1854, pp. 718–731, 2015.
- [6] F. Lechene, Claude Hillion, G. McMahon, D. Benson, A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, D. Distel, Y. Luyten, J. Bonventre, D. Hentschel, K. M. Park, S. Ito, M. Schwartz, G. Benichou, and G. Slodzian, “High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry,” *Journal of biology*, vol. 5, no. 6, p. 20, 2006.
- [7] T. B. Angerer, M. Dowlatshahi Pour, P. Malmberg, and J. S. Fletcher, “Improved molecular imaging in rodent brain with time-of-flight-secondary ion mass spectrometry using gas cluster ion beams and reactive vapor exposure,” *Analytical Chemistry*, vol. 87, no. 8, pp. 4305–4313, 2015.
- [8] C. N. R. Rao, A. K. Sood, K. S. Subrahmanyam, and A. Govindaraj, “Graphene: The new two-dimensional nanomaterial,” vol. 48, no. 42, pp. 7752–7777, 2009.
- [9] X. Dong, J. Cheng, J. Li, and Y. Wang, “Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS,” *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 14, pp. 6208–6214, 2010.
- [10] W. L. Friesen, B. J. Schultz, J. F. Destino, T. E. G. Alivio, J. R. Steet, S. Banerjee, and T. D. Wood, “Two-Dimensional Graphene as a Matrix for MALDI Imaging Mass Spectrometry,” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 26, no. 11, pp. 1963–1966, 2015.
- [11] Alexander AIUS, “Graphene.jpg,” 2010.
- [12] L. Cai, L. Sheng, M. Xia, Z. Li, S. Zhang, X. Zhang, and H. Chen, “Graphene Oxide as a Novel Evenly Continuous Phase Matrix for TOF-SIMS,” *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2016.
- [13] F. Cooper, “United States Patent [191],” pp. 3–5, 1981.
- [14] D. E. Bornside, C. W. Macosko, and L. E. Scriven, “Spin coating: One-dimensional model,” *Journal of Applied Physics*, vol. 66, no. 11, pp. 5185–5193, 1989.
- [15] TM-Sprayer, “Tissue MALDI Sample Preparation System,”
- [16] “Electron Backscatter Diffraction in Materials Science,”
- [17] A. C. Inc., “DUAKLIR™ GENUAIR® now available in Canada for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease,” 2015.
- [18] D. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments 8th edition*. 2013.
- [19] I. T. Jolliffe, “Principal Component Analysis, Second Edition,” *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*, vol. 30, no. 3, p. 487, 2002.
- [20] W. S. Hummers and R. E. Offeman, “Preparation of Graphitic Oxide,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 80, no. 6, p. 1339, 1958.

- [21] J. Chen, B. Yao, C. Li, and G. Shi, "An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide," *Carbon*, 2013.
- [22] S. O. Deininger, D. S. Cornett, R. Paape, M. Becker, C. Pineau, S. Rauser, A. Walch, and E. Wolski, "Normalization in MALDI-TOF imaging datasets of proteins: Practical considerations," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 401, pp. 167–181, 2011.
- [23] M. Dowlatshahi Pour, P. Malmberg, and A. Ewing, "An investigation on the mechanism of sublimed DHB matrix on molecular ion yields in SIMS imaging of brain tissue," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, no. 12, pp. 3071–3081, 2016.
- [24] I. Gustafson, "Phospholipid membranes in biosensor applications Stability , activity and kinetics of reconstituted proteins and glycolipids in supported membranes," *Sites The Journal Of 20Th Century Contemporary French Studies*, 2004.
- [25] O. M. Kvalheim and T. V. Karstang, "Chapter 7 SIMCA - Classification by Means of Disjoint Cross Validated Principal Components Models," *Data Handling in Science and Technology*, vol. 9, pp. 236–238,242, 1992.
- [26] Y. L. Li, X. Su, P. D. Stahl, and M. L. Gross, "Quantification of diacylglycerol molecular species in biological samples by electrospray ionization mass spectrometry after one-step derivatization," *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 4, pp. 1569–1574, 2007.

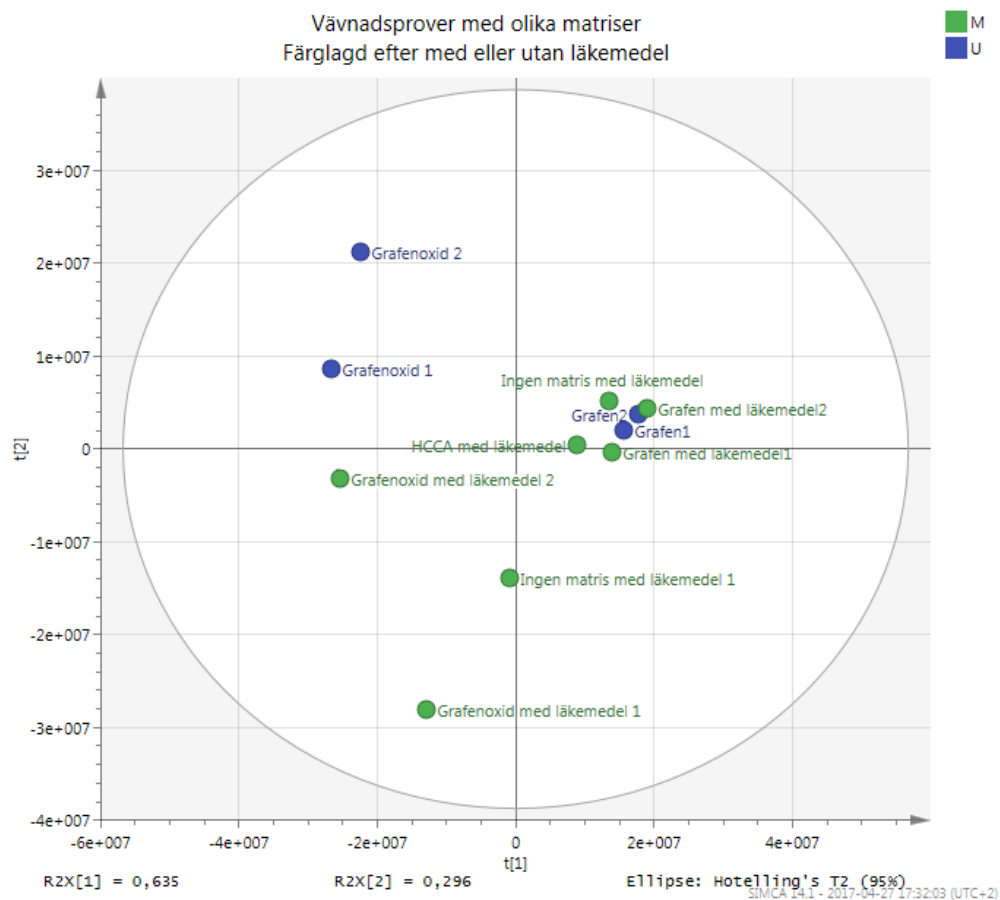
A Bilaga - PCA

Tabellen visar en förkortad version av hur datan analyserades med PCA. För fullständig version, kontakta projektgruppen.

Tabell A.1: Förenklad version av excel-dokument som användes vid PCA-utvärdering. Elva vävnadsprover med gruppbezeichnung, förenklade namn, och molekylmassor. Gruppindelning bestämdes efter typ av matris, G för grafen, H för HCCA, I för ingen matris och GO för grafenoxid. Förenklade namn bestämdes efter typ av matris och huruvida provet innehöll läkemedel eller inte. Molekylmassorna (22,995 Da, 27,0242 Da, 28,0299 Da) visas i tabellen endast för att få en överblick hur resultaten erhöles och för att se intensiteten av masstopparna.

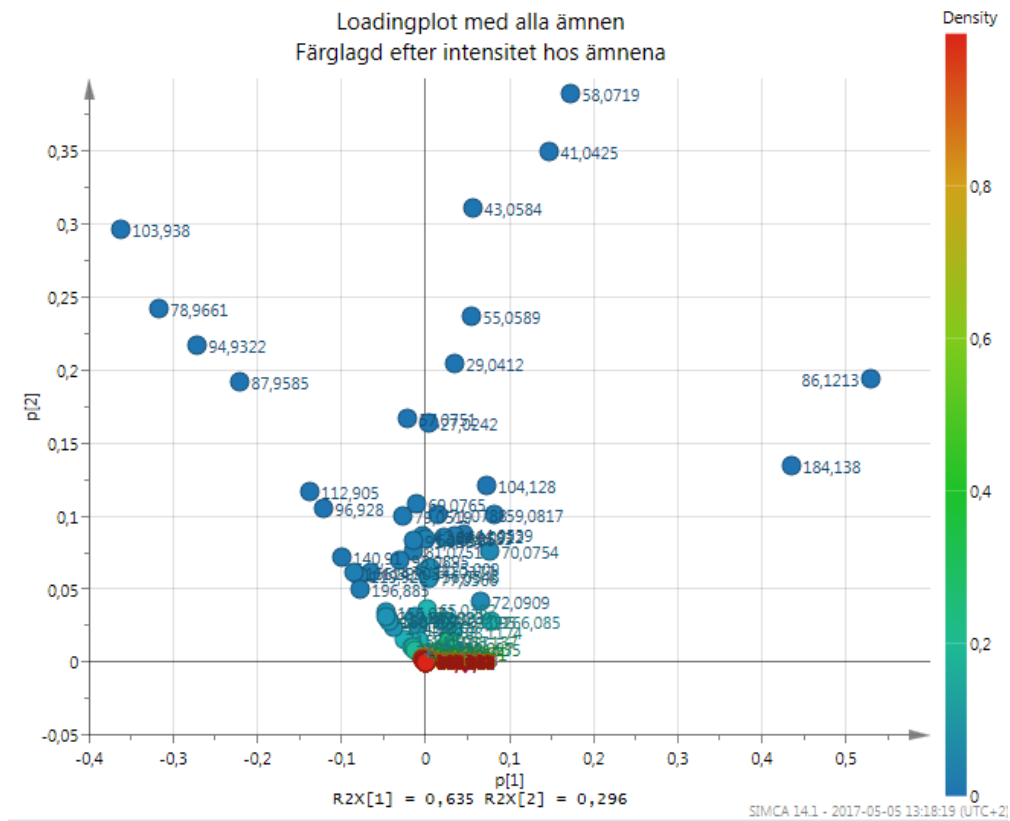
Grupp	Förenklade namn	22,995	27,0242	28,0299	resterande 148 masstop- par
G	Grafen 1	7167134,38	3812369,39	578461,88	...
G	Grafen med läkemedel 1	6675664,68	3639241,57	525833,98	...
G	Grafen 2	4118720,93	3928623,45	598711,2	...
G	Grafen med läkemedel 2	8812375,06	4091000,07	563276,88	...
H	HCCA med läkemedel	8929891,49	4639985,13	1051445,47	...
I	Ingen matris med läkemedel 1	8728366,59	2858553,57	322426,53	...
I	Ingen matris med läkemedel 2	19957887,21	6210453,34	601652,41	...
GO	Grafenoxid 1	34389591,07	5529995,59	1073594,43	...
GO	Grafenoxid med läkemedel 2	6950117,84	665639,86	32393,29	...
GO	Grafenoxid 2	79183592,48	8887427,24	1748179,79	...
GO	Grafenoxid med läkemedel 1	1345334,31	280630,83	55048,18	...

I figur A.1 visas samma scoreplot som visas i bild (a) i figur 8.14 med skillnad att mätningarna har grupperats efter om proverna innehåller läkemedel eller ej. Prover med läkemedel har markerats grönt och prover utan läkemedel har markerats i blått. Vad som konstateras är att läkemedlet inte spelar någon roll för PCA-utvärderingen, eftersom de prover med läkemedel inte ligger nära varandra.



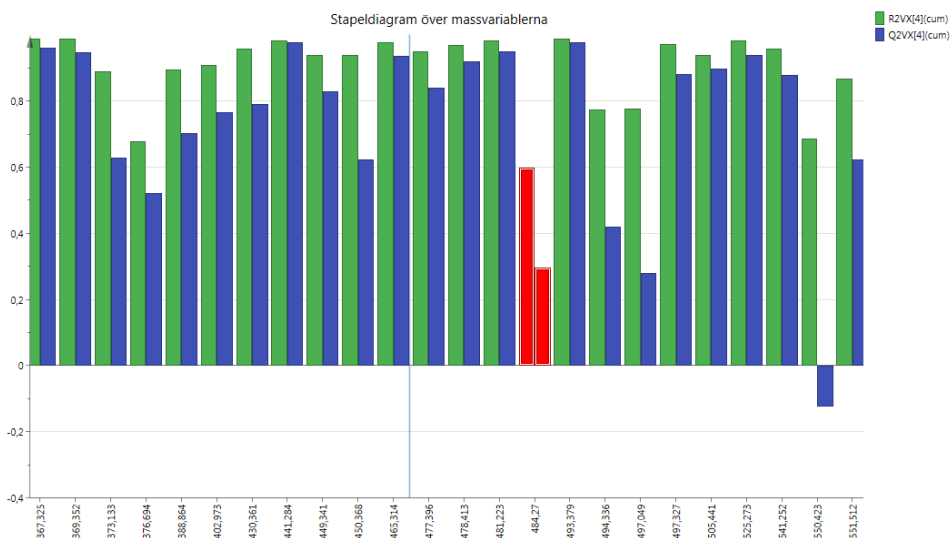
Figur A.1: PCA med gruppering baserad på om undersökningarna innehåller läkemedel eller inte. Figuren visar att läkemedlet inte påverkar modellen. Undersökningar med läkemedel ligger inte nära varandra.

Figur A.2 visar den totala loadingplotten för de elva matrismätningarna. Alla ämnen presenteras efter intensitet i de olika proverna, med ett rött kluster i origo där majoriteten befinner sig. Att flertalet placeras i origo innebär att de finns i hög intensitet i alla prover.



Figur A.2: Loadingplot över alla ämnen från PCA-undersökningen.

I figur A.3 visas ett stapeldiagram över hur väl de olika masstopparna stämmer med modellen baserade på R^2 - och Q^2 -värden. Läkemedelsmolekylen är markerad i rött.



Figur A.3: Figuren visar hur väl masstopparna som enskilda variabler stämmer överens med de förutsagda variablerna. Här visas läkemedlet markerat i rött med ett lågt R^2 -värde, och ett negativt Q^2 -värde. Läkemedlet som enskild topp påverkar inte undersökningen. Det är därför de olika grafenmatrisundersökningarna ligger nära varandra, trots att vissa har tillagd läkemedelsmolekyl.

Ett högt R^2 -värde för en masstopp innebär att just denna topp inte varierar i storlek i jämförelse med de andra topparna. Ett högt Q^2 -värde påvisar samma sak som R^2 -värdet fast starkare då Q^2 är medianen för värdena i denna topp och ändras inte radikalt om fler eller färre datapunkter används, medan R^2 kommer öka med fler datapunkter. Att läkemedlet har lågt R^2 - och lågt Q^2 -värde innebär att matriserna har liknande egenskaper oberoende om läkemedel har droppats på vävnadsproven då läkemedelstoppen jämförs tillsammans med alla andra 151 masstoppar.

B Bilaga - ANOVA

I tabellerna B.1 till B.4 nedan visas resultatet från ANOVA för de olika masslistorna inom intervallet 500-900 Da, se avsnitt 7.3 för detaljerad information om de olika masslistorna. ANOVA-tabellerna visar om det är en signifikant skillnad i intensitet beroende på vilken matris som används och vilken masstopp som analyseras. Vid signifikanta skillnader är F_0 -värdet högre än F_{stat} -värdet. SS står för sum of squares, Df för frihetsgrader (från engelskans degrees of freedom) och MS för kvadratisk medelvärde (från mean square). F_{stat} -värdena är de statistiska tabellvärden som F_0 -värdet jämförs mot. Siffran i parentesen indikerar om konfidensgraden är 95% eller 99%. Tabellerna visar att det finns en statistiskt signifikant skillnad mellan matriserna samt mellan masstopparna både på 95 procents och 99 procents konfidensgrad.

Tabell B.1: ANOVA-tabell för masslistan skapad utifrån grafenprover.

Källa	SS	Df	MS	F_0	$F_{stat}(95)$	$F_{stat}(99)$
Matris	$2,25 \times 10^8$	10	$2,25 \times 10^7$	18,62	1,83	2,32
Toppar	$4,41 \times 10^8$	24	$1,84 \times 10^7$	15,23	1,52	1,79
Error	$2,90 \times 10^8$	240	$2,21 \times 10^6$			
Total	$9,56 \times 10^8$	274				

Tabell B.2: ANOVA-tabell för masslistan skapad utifrån grafenoxidprover.

Källa	SS	Df	MS	F_0	$F_{stat}(95)$	$F_{stat}(99)$
Matris	$8,09 \times 10^9$	10	$8,09 \times 10^8$	42,52	1,83	2,32
Toppar	$2,44 \times 10^9$	26	$9,37 \times 10^7$	4,92	1,52	1,79
Error	$4,95 \times 10^9$	260	$1,90 \times 10^7$			
Total	$1,55 \times 10^{10}$	296				

Tabell B.3: ANOVA-tabell för masslistan skapad utifrån HCCA-prover.

Källa	SS	Df	MS	F_0	$F_{stat}(95)$	$F_{stat}(99)$
Matris	$1,23 \times 10^8$	10	$1,23 \times 10^7$	4,27	2,08	2,80
Toppar	$2,87 \times 10^8$	5	$5,74 \times 10^7$	19,87	2,45	3,51
Error	$1,44 \times 10^8$	50	$2,89 \times 10^6$			
Total	$5,55 \times 10^8$	65				

Tabell B.4: ANOVA-tabell för masslistan skapad utifrån prover utan matris.

Källa	SS	Df	MS	F_0	$F_{stat}(95)$	$F_{stat}(99)$
Matris	$1,16 \times 10^8$	10	$1,16 \times 10^7$	9,45	1,91	2,47
Toppar	$5,04 \times 10^8$	10	$5,04 \times 10^7$	41,04	1,91	2,47
Error	$1,23 \times 10^8$	100	$1,23 \times 10^6$			
Total	$7,43 \times 10^8$	120				